

**UNTERSUCHUNGEN
ZUR POLYADENYLIERUNG
VON RNA IN B. BREVIS,
STAMM ATCC 9999**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie (21)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Altmann
aus Frankfurt/Main
Berlin 1984



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41546612_0052

UNTERSUCHUNGEN ZUR POLYADENYLIERUNG VON RNA
IN B. BREVIS, STAMM ATCC 9999

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung des Doktorgrades
des Fachbereichs Chemie (21)
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Michael Altmann
aus
Frankfurt/Main

Berlin 1984

1. Referent: Prof. Dr. E.-R. Lochmann

2. Referent: Prof. Dr. E. Riedel

Tag der mündlichen Prüfung: 26.3.1984

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	THEMA DER ARBEIT	6
2.	ALLGEMEINER TEIL	7
2.1	Poly(A)-RNA in eukaryotischer mRNA	7
2.2	Vorkommen von poly(A)-RNA in Prokaryoten	16
3.	MATERIAL UND METHODEN	20
3.1	Abkürzungen	20
3.2	Chemikalien und Enzyme	21
3.3	Medien	22
3.4	Stämme	22
3.5	Puffer	23
3.6	Anzucht von Zellen	25
3.7	<u>In-vivo</u> -Markierung von Zellen mit ^3H -Adenosin oder ^3H -Uridin	25
3.8	Präparation von gesamtzellulärer RNA	26
3.9	Präparation von Polyribosomen	27
3.10	Bestimmung des poly(A)-Gehalts durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U)	28
3.11	Reinigung von poly(A)-RNA über oligo(dT)- Cellulose	29
3.12	Untersuchungen durch Ultrazentrifugation	30
3.12.1	Sedimentationsanalyse der Polyribosomen	30
3.12.2	Charakterisierung der RNA durch Ultra- zentrifugation	30
3.13	Präparation von poly(A)-Segmenten durch Verdauung mit RNase A und T_1	31
3.14	Bestimmung der Position der poly(A)-Segmente durch Verdauung mit Schlangengift-Phosphodiesterase	31
3.15	Alkalische Hydrolyse der poly(A)-Segmente	32
3.16	Bestimmung der poly(A)-Länge durch Polyacrylamid-Gelelektrophorese	32
3.17	Präparation der zellfreien Extrakte	33
3.17.1	S-150 Extrakt aus <u>B.brevis</u> (ATCC 9999)	33
3.17.2	S-30 Extrakt aus <u>E.coli</u> D-10	33

	Seite
3.18 Zellfreie <u>in-vitro</u> -Translation	34
3.18.1 Translation von gesamtzellulärer RNA	34
3.18.2 Translation von Polyribosomen	35
3.19 Analyse der <u>in-vitro</u> -Translationsprodukte	35
4. ERGEBNISSE	38
4.1 <u>In-vivo</u> -Markierung von <u>B.brevis</u> -Zellen mit radioaktiven RNA-Vorstufen	39
4.2 Optimierung der RNA-Präparationsmethode	41
4.3 Charakterisierung der gesamtzellulären poly(A)-RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen	43
4.3.1 Präparation von gesamtzellulärer RNA aus pulsmarkierten Zellen	43
4.3.2 Anreicherung von pulsmarkierter poly(A)-haltiger RNA durch Affinitätschromatographie	45
4.3.3 Charakterisierung der pulsmarkierten gesamtzellulären RNA durch Ultrazentrifugation	47
4.3.4 Einfluß des Wachstumsmediums auf die Polyadenylierung der gesamtzellulären RNA	51
4.3.5 Bestimmung der poly(A)-Segmente von gesamtzellulärer RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen	53
4.3.5.1 Verdauungsexperimente mit RNase A und T ₁	53
4.3.5.2 Bestimmung der Position der poly(A)-Segmente innerhalb der poly(A)-RNA-Sequenz	55
4.3.5.3 Bestimmung der poly(A)-Kettenlängen von poly(A)-RNA	58
4.3.6 Poly(A)-Gehalt von gesamtzellulärer nicht-pulsmarkierter RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen	62
4.4 Optimierung der Polyribosomen-Präparationsmethode	64
4.5 Charakterisierung der polyribosomalen poly(A)-RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen	66
4.5.1 Präparation von Polyribosomen aus pulsmarkierten Zellen	66
4.5.2 Anreicherung von polyribosomaler poly(A)-RNA durch Affinitätschromatographie	67

	Seite
4.5.3 Charakterisierung der polyribosomalen poly(A)-RNA durch Ultrazentrifugation	68
4.5.4 Bestimmung des poly(A)-Gehalts von polyribosomaler poly(A)-RNA nach Verdauung mit RNase A und T ₁	70
4.5.5 Poly(A)-Gehalt von polyribosomaler nicht-puls-markierter RNA	71
4.6 <u>In-vitro</u> -Translationsuntersuchungen	72
4.6.1 <u>In-vitro</u> -Translation der gesamtzellulären RNA	72
4.6.1.1 Isolierung und Optimierung eines geeigneten zellfreien Extraktes	72
4.6.1.2 <u>In-vitro</u> -Translation der einzelnen RNA-Proben unterschiedlicher Wachstumsphasen	74
4.6.2 Untersuchungen der <u>in-vitro</u> -Translationsaktivität von Polyribosomen	80
5. DISKUSSION	83
5.1 Die Polyadenylierung von RNA in <u>B.brevis</u> (ATCC 9999)	83
5.2 Vergleich der Eigenschaften von prokaryotischer poly(A)-RNA	87
5.3 <u>In-vitro</u> -Translation von mRNA aus <u>B.brevis</u> (ATCC 9999)	92
5.4 Zur möglichen Funktion der Polyadenylierung von RNA	94
5.5 Aussichten	96
6. ZUSAMMENFASSUNG	98
LITERATURVERZEICHNIS	100

1. THEMA DER ARBEIT

In dieser Arbeit wird das Vorkommen von polyadenylierter Ribonucleinsäure im prokaryotischen System Bacillus brevis - Stamm ATCC 9999 - untersucht.

Es werden Präparationsmethoden für Polyribosomen und gesamtzelluläre RNA entwickelt, die eine reproduzierbare Untersuchung der Polyadenylierung von RNA in Abhängigkeit der Wachstumsphase des Organismus und des Anzuchtmediums ermöglichen. Die unterschiedlichen RNA-Fraktionen werden charakterisiert, indem sowohl die Position innerhalb der RNA-Kette, als auch die Länge der poly(A)-Segmente bestimmt werden.

Diese Untersuchungen sollen einen Beitrag zur Klärung der Frage liefern, inwieweit der Vorgang der Polyadenylierung von RNA im Zusammenhang mit einem Differenzierungsprozeß von prokaryotischen Zellen beim Übergang in die stationäre Wachstumsphase steht. Um nachweisen zu können, daß die poly(A)-haltige RNA aus Bacillus brevis auch mRNA ist, wird ein hocheffizientes in-vitro-Translationssystem aus E. coli entwickelt, in dem die Übersetzung der poly(A)-RNA aus B. brevis gelingt; deren Translationseigenschaften und -produkte werden mit denen der entsprechenden nicht poly(A)-haltigen RNA verglichen; damit soll die Frage geklärt werden, ob die Polyadenylierung der mRNA in B. brevis eine weit verbreitete Eigenschaft ist oder nur bestimmte mRNA-Populationen betrifft.

2. ALLGEMEINER TEIL

2.1 Poly(A)-RNA in eukaryotischer mRNA

Seit 1970 ist das Vorkommen von poly(A)-Sequenzen als ein weit verbreitetes Phänomen in eukaryotischen Zellen bekannt. In diesem Zeitraum hat sich eine Vielzahl von Arbeitsgruppen mit dem weiten Spektrum der Fragen beschäftigt, die zur Aufklärung der Funktion von poly(A) führen sollten. Die Ergebnisse dieser Arbeiten sind in verschiedenen Übersichtsartikeln der letzten Jahre (Karpetsky et al., 1979; Brawerman, 1981; Littauer und Soreq, 1982) zusammenhängend dargestellt worden.

Die Untersuchungen über die Rolle von poly(A) in eukaryotischen Zellsystemen liefern ein komplexes Bild mit verschiedenen möglichen Funktionen. Deshalb läßt sich bisher auch kein einfaches Funktionsmodell mit Allgemeingültigkeit für poly(A) aufstellen.

Ein großer Teil der eukaryotischen und viralen mRNA enthält am 3'-Ende der Nucleotidsequenz eine nicht-translatierte RNA-Sequenz, die von einem poly(A)-Segment mit 50 bis zu 250 Adenosinresten beendet wird (Brawerman, 1975; Wilt, 1973). Diese Polynucleotidsequenz wird nicht von nuklearer DNA codiert, sondern posttranskriptional von Poly(A)-Polymerasen an das 3'-Ende der mRNA ankondensiert. Die Polyadenylierung findet unmittelbar nach der Transkription im Zellkern statt, bevor die heteronukleare RNA prozessiert und in das Cytoplasma transportiert wird. Dort werden die Poly(A)-Segmente in eine kürzere, heterogene Poly(A)-Population durch spezifische Ribonucleasen überführt. In dieser Größenverteilung, die für verschiedene mRNAs durchaus unterschiedlich ist, verweilen die mRNA-Populationen im Cytoplasma über längere Zeiträume hinweg ("steady-state" oder stationärer Zustand) (Mendecki et al., 1972; Greenberg und Perry 1972b; Wilt, 1973; Derman und Darnell, 1974; Diez und Brawerman, 1974; Brawerman und Diez, 1975; Sheiness und Darnell, 1973; Wilson et al., 1978).

Allerdings findet auch im Cytoplasma Polyadenylierung von RNA



statt, so daß die Durchschnittslänge der poly(A)-Sequenzen im stationären Zustand das Resultat der gegenseitigen Wirkung von poly(A)-anabolischen und poly(A)-katabolischen Enzymen ist (Müller et al., 1983), als Folge dieses sich verändernden Gleichgewichts nimmt die Länge der poly(A)-Segmente von mRNA im fortschreitenden Alter ab (Müller et al., 1977).

Zusammenfassend kann man sagen, daß die charakteristische Größenverteilung der poly(A)-Segmente der verschiedenen mRNAs sowohl typus- wie auch altersabhängig ist.

Eine wichtige Rolle für die Erhaltung der charakteristischen Größenverteilung von poly(A)-Segmenten spielen sicherlich die poly(A)-bindenden Proteine (Soreq et al., 1974; Kwan und Brawerman, 1972; Bergmann und Brawerman, 1977; Müller et al., 1978), die auch mit den nicht-translatierten Regionen am 3'-Ende der mRNA wechselwirken (Bergmann und Brawerman, 1977; Jeffery, 1978) und diese Regionen vor nucleolytischem Abbau schützen. Diese Protein-RNA- (man spricht von mRNP - "messenger-ribonucleic-protein") Komplexe interagieren auch mit translatierten Regionen; dadurch verändert sich die Sekundär- und Tertiärstruktur der mRNA, und ein besserer Schutz der gesamten mRNA vor nucleolytischem Abbau - sowohl der translatierten Regionen, wie auch der poly(A)-Sequenzen - wird gewährleistet.

Das Vorkommen von poly(A)-Segmenten am 3'-Ende eukaryotischer mRNA ist zwar ein weit verbreitetes Phänomen, das entgegen erster Annahmen (Adesnik und Darnell, 1972; Greenberg und Perry, 1972a) auch bei Histon-mRNAs oft vorkommt (so z.B. bei Hefen und dem Einzeller Tetrahymena (Bannon et al., 1983)), trotzdem enthalten sehr viele mRNA-Populationen einen bedeutenden Anteil nicht polyadenylierter mRNA (siehe dazu auch den Übersichtsartikel von Katinakis et al., 1980). Es gibt auch mehrere Beispiele für mRNAs, die nur in nicht-polyadenylierter Form vorkommen - wie einige mRNAs von Reovirus (Stoltzfus et al., 1973) und die meisten viralen mRNAs höherer Pflanzen (Semancik, 1974).

In diesem Zusammenhang muß erwähnt werden, daß der Begriff "nicht poly(A)-haltig" nur begrenzt richtig ist, da die konventionellen Methoden zur Trennung von poly(A)-haltiger RNA

kurze poly(A)-Stränge (kleiner als 15 Nucleotide) nicht erfassen können. So ist in Wirklichkeit nicht poly(A)-haltige RNA ein Gemisch aus sehr kurzketziger poly(A)-RNA und RNA ohne poly(A). Trotz einiger widersprüchlicher Berichte (siehe dazu Karpetsky et al., 1979) tendieren die meisten Publikationen der letzten Jahre zur Feststellung, daß beide mRNA-Populationen für die gleichen Translationsprodukte codieren (Kaufmann et al., 1977; Mager et al., 1975; Gray und Cashmore, 1976; Iatrou und Dixon, 1977; Gedamu und Dixon, 1976).

Im folgenden werden - im Überblick - die verschiedenen vorgeschlagenen Funktionen von poly(A) am 3'-Ende der mRNA kurz beschrieben und diskutiert:

1) Poly(A) und mRNA-Biogenese

Einer der ersten modifizierenden Schritte nach vollendeter Synthese der Primärtranskripte ist die Polyadenylierung am 3'-Ende, bevor die intervenierenden Sequenzen (Introns) herausgeschnitten werden ("Splicing") (Kinniburgh et al., 1978; Bastos und Aviv, 1977; Schibler et al., 1978; Gerlinger et al., 1982).

Untersuchungen zur Prozessierung der Primärtranskripte des Adenovirus (Goldenberg und Raskas, 1979) und des Affenvirus SV-40 (Lai et al., 1978) haben ergeben, daß alle "reifen" mRNAs aus polyadenylierten Vorstufen durch endonucleolytische Spaltungen hervorgehen, wobei die jeweils entstehenden freien 3'-Termini wiederum polyadenyliert werden.

Der Teil des Adenovirus-Genoms, der für die im Infektionszyklus "späten" Transkriptionsprodukte codiert, liefert ein Primärtranskript, aus dem durch Prozessierung 14 verschiedene mRNAs hervorgehen, welche sich wiederum in fünf verschiedene 3'-coterminale Klassen einstufen lassen (Fraser et al., 1979), die alle polyadenyliert werden.

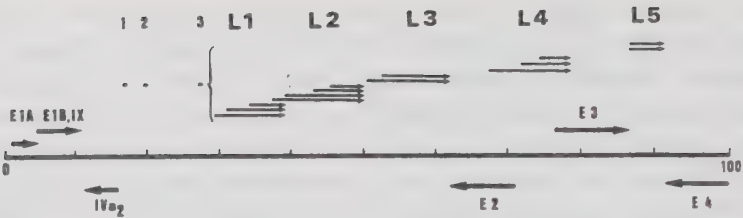


Bild 1: Aus der Prozessierung des "späten" Primärtranskripts von Adenovirus entstehen durch gezielte endonucleolytische Spaltung und anschließende Polyadenylierung fünf 3'-coterminal mRNA-Klassen (L1 - L5), aus denen 14 mRNAs hervorgehen (Bild aus Le Moullec et al., 1983)

Die unmittelbare Kopplung von endonucleolytischer Spaltung und Polyadenylierung der entstehenden 3'-Enden ließen die Vermutung zu, daß innerhalb der Sequenz des Primärtranskripts spezifische Erkennungsstellen für eine Polyadenylierung vorkommen, die im Prozessierungsvorgang involviert sind. Es wurde bei vielen prozessierten mRNAs 12 bis 30 Nukleotide vor dem - durch endonucleolytische Spaltung entstehenden - 3'-Ende eine hexamere Konsensussequenz - AAUAAA - gefunden (Proudfoot und Brownlee, 1976; Fitzgerald und Shenk, 1981; Le Moullec et al., 1983).

Durch Punktmutation im Bereich der hexameren Sequenz auf dem Genom von Adenovirus gelingt neuerdings der Nachweis, daß diese Sequenz als Erkennungszeichen für die spezifische endonucleolytische Spaltung, jedoch nicht für die Polyadenylierungsreaktion dient (Montell et al., 1983).

Ein Modell für die Beteiligung von poly(A)-Sequenzen bei der Prozessierung von heteronuklearer RNA ist in einer theoretischen Arbeit (Bina et al., 1980) vorgeschlagen worden. Ausgangspunkt ist die Überlegung, daß intervenierende Sequenzen (Introns) untereinander nur eine sehr beschränkte Sequenzhomologie besitzen und wahrscheinlich trotzdem nach einem gemeinsamen Mechanismus - vielleicht von nur einem einzigen Enzym oder Enzymkomplex - erkannt und herausgeschnitten werden. Die Konsensussequenzen

G-U am 5'-Ende und A-G am 3'-Ende der Introns reichen wohl kaum aus, um die Spezifität der Schnittstellen der unterschiedlichsten Intronsequenzen zu bestimmen. Auffällig ist allerdings das häufige Auftreten von homopolymeren poly(A)-Strukturen (3-7 Adenosinreste) am 5'-Ende und homopolymeren poly(U)-Strukturen (3-7 Uridylreste) am 3'-Ende der zu prozessierenden Introns. Aufgrund von Untersuchungen der Tertiärstruktur von tRNAs und synthetischen Polyribonucleotiden (vor allem von poly(A)- und poly(U)-Komplexen) schlagen die Autoren ein Modell vor, bei dem das poly(A)-Segment am 3'-Ende der heteronuklearen RNA eine Tripelhelix mit der Sequenz am 5'-Ende und am 3'-Ende des Introns bildet.

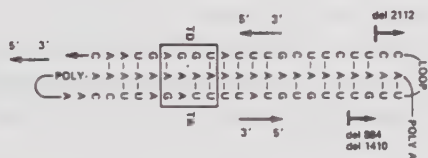


Bild 2: Modell für die Prozessierung eines Introns der heteronuklearen RNA des Affenvirus SV-40 (gezeigt wird ein Ausschnitt der Sequenz am 5'- und am 3'-Ende). Das poly(A)-Segment am 3'-Ende bildet eine Tripelhelix mit Bereichen des 5'- und des 3'-Endes des Introns (aus Bina et al., 1980)

Bei der Ausbildung der Tripelhelix, die durch Crick-Watson-, aber auch durch andere Basenpaarungen (z.B. Hogsteen-Paarungen zwischen A und U und A-A-Selbstpaarungen) zusammengehalten wird, wären nur die Sequenzen am 5'-Ende und am 3'-Ende (jeweils 15 bis 30 Nucleotide) beteiligt, die intermediären Bereiche des Introns würden eine Schleife ("loop") variabler Länge bilden, deren Sequenz für den Vorgang des "Splicing" unerheblich wäre. Die gestapelte Basenstruktur der Tripelhelix würde als spezifische Erkennungsregion für die Endonuclease dienen.

Obwohl eine Beteiligung von Polyadenylierungsreaktionen bei der Selektion von zu prozessierenden mRNA-Vorstufen nicht auszuschließen ist, scheinen es doch zwei voneinander unabhängige Vorgänge zu sein. Dafür spricht letztendlich auch die Tatsache, daß ein Teil der Primärtranskripte und ihrer prozessierten Folgeprodukte kein poly(A)-Segment am 3'-Ende enthalten und trotzdem korrekt prozessiert werden (Zeevi et al., 1981).

2) Poly(A)-Funktion beim Transport von mRNA vom Zellkern in das Cytoplasma

Da die Polyadenylierung von RNA dem nucleoplasmatischen Transport von mRNA vorausgeht, wird von einigen Arbeitsgruppen die Primärfunktion von poly(A) dem Messenger-Transport zugeschrieben (Schwartz und Darnell, 1976; Adesnik und Darnell, 1972; Darnell, 1976).

Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, daß eine kernmembranspezifische Nucleosid-Triphosphatase beim Transport der mRNA in das Cytoplasma beteiligt ist (Agutter und Richardson, 1980). Die Aktivität dieses Enzyms wird durch den poly(A)-Anteil der mRNA stimuliert (Bernd et al., 1982).

Außer diesen direkten Hinweisen gibt es jedoch keine Beweise für die Beteiligung von poly(A) beim Messengertransport in das Cytoplasma. Dagegen spricht allerdings die Tatsache, daß nicht-poly(A)-haltige RNA auch in das Cytoplasma transportiert wird; dies konnte z.B. mit mRNA aus Seeigelembryos (Nemer et al., 1975) oder mit nicht-polyadenylierter nuklearer RNA des Adenovirus Typ 2 (Zeevi et al., 1982) gezeigt werden.

Ein weiteres wichtiges Argument für andere Funktionen als die des Transports von mRNA ist das Vorkommen von poly(A)-Sequenzen bei mitochondrialer RNA (Perlman et al., 1973; Hirsch und Penman, 1973; Hirsch und Penman, 1974; Ojala und Attardi, 1974 a+b; Cleaves et al., 1976), die größtenteils in den Mitochondrien selbst transkribiert wird (Lewis et al., 1976). Auch das Vorkommen von poly(A) in prokaryotischer RNA - Thema dieser Arbeit - ist ein Argument gegen die Transportfunktion von poly(A).

3) Poly(A) und die Stabilität der mRNA

In einer Vielzahl von in-vivo- und in-vitro-Experimenten konnte bisher gezeigt werden, daß poly(A)-Segmente die strukturelle und damit die funktionelle Integrität von mRNA durch Schutz vor RNasen-Abbau gewährleisten können. Dies erscheint einleuchtend, wenn man bedenkt, daß poly(A) ein starker kompetitiver Inhibitor von verschiedenen RNasen ist (Levy et al., 1975; Hieter et al., 1976; Frank und Levy, 1976; Neuwelt et al., 1976; Karpetsky et al., 1977).

Nachdem in-vitro-Versuche zur Translation von adenylierter und nicht-adenylierter RNA in verschiedenen zellfreien Systemen zu widersprüchlichen Ergebnissen führten (siehe dazu: Brawerman, 1981), konnten Versuche durch Mikroinjektion von mRNA in Oocyten des Amphibiums Xenopus laevis eindeutig zeigen, daß polyadenylierte Globin-mRNA über 50 Stunden in den Oocyten stabil bleibt, enzymatisch deadenylierte Globin-mRNA dagegen bereits nach zwei Stunden zur Hälfte abgebaut wird - und dies, obwohl beide mRNA-Sorten die gleiche Anfangsrate in der Translationsaktivität zeigen (Huez et al., 1974; Nudel et al., 1976). Durch eine neue enzymatische Adenylierung der Globin-mRNA kann die mRNA-Stabilität im vollen Umfang wiederhergestellt werden (Huez et al., 1975). Weiterhin konnte gezeigt werden, daß eine poly(A)-Minimallänge von ca. 30 Nucleotiden zur Erhaltung der Stabilität erforderlich ist; Globin-mRNA mit nur 16 Adenosinmolekülen als poly(A)-Strang verhält sich wie völlig deadenylierte mRNA (Nudel et al., 1976). Offensichtlich muß eine Minimallänge der poly(A)-Kette gewährleistet sein, damit eine Schutzfunktion der mRNA eintreten kann.

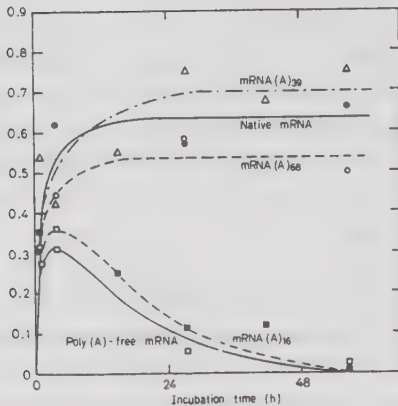


Bild 3: Relative Stabilität von Globin-mRNA in Abhängigkeit der poly(A)-Länge (getestet durch Mikroinjektion in Xenopus laevis-Oocyten, aus Nudel et al., 1976)

Daß dieser Stabilisierungseffekt nicht eine Besonderheit von Globin-mRNA ist, konnte durch Mikroinjektion von enzymatisch polyadenylierter Histon-mRNA gezeigt werden (Huez et al., 1978), die in Xenopus laevis-Oocyten reichlich vorkommt, aber nur kurzlebig und nicht polyadenyliert ist (Grunstein und Schedl, 1976; Woodland und Wilt, 1980).

Ähnliche Stabilisierungseffekte durch Polyadenylierung von mRNA konnten durch Mikroinjektion auch in anderen Systemen festgestellt werden, so z.B. in HeLa-Zellen (Huez et al., 1981). Einige bemerkenswerte Ausnahmen, die diesen Stabilisierungseffekt nicht zeigen, sind die Interferon-mRNA (Soreq et al., 1981; Sehgal et al., 1978) und die Mengovirus-mRNA (Littauer et al., 1980).

4) Poly(A) und Proteinsynthese

Erste Untersuchungen der Translationsaktivität verschiedener mRNAs, die enzymatisch deadenyliert waren (z.B. Globin-mRNA und Gesamt-RNA aus Mäusezellen), zeigen weder in-vivo noch in-vitro eine unterschiedliche Anfangsrate der Translationsaktivität im

Vergleich zur natürlich vorkommenden polyadenylierten mRNA (So-req et al., 1974; Huez et al., 1974; Bard et al., 1974; Sippel et al., 1974). Daraus schließt man, daß die poly(A)-Sequenzen keinen Einfluß auf die Proteinsynthese haben.

Doch viele dieser Experimente sind mit weniger aktiven Zellextrakten durchgeführt worden, wo wenig Reinitiation der Messengertranslation an den Ribosomen stattfindet. Mit Hilfe von hochaktiven Reticulocyten-Extrakten konnte dagegen gezeigt werden, daß polyadenylierte Hühner-Ovalbumin-mRNA mit höherer Effizienz als deadenylierte mRNA translatiert wird (Doel und Carey, 1976).

Neuere Untersuchungen mit polyadenylierter mRNA aus Dictyostelium (Jacobson und Favreau, 1983) deuten darauf hin, daß die poly(A)-Segmente - vermutlich unter Mitbeteiligung von poly(A)-bindenden Proteinen - eine Wechselwirkung der mRNA mit Komponenten des Translationsapparats (z.B. Initiationsfaktoren, Ribosomen oder Cytoskeleton) erleichtern könnten.

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen allerdings noch zu wenige schlüssige Informationen vor, die eine Beteiligung der poly(A)-Sequenzen bei der Translation beweisen.

Allerdings lassen sich die beiden zuletzt diskutierten Funktionen, nämlich die erhöhte Stabilität der mRNA und eine Begünstigung der Translationseffektivität durch poly(A)-Sequenzen, durch ein einfaches Strukturmodell erklären: Enthält nämlich die mRNA kein poly(A) oder ist diese Sequenz zu kurz, können sich auch nicht die poly(A)-bindenden Proteine anlagern. Dadurch kann sowohl die Schutzfunktion (hervorgerufen durch Veränderung der mRNA-Tertiärstruktur), als auch die Fähigkeit, mit anderen Komponenten des Translationsapparats in Wechselwirkung zu treten, verloren gehen.

2.2 Vorkommen von poly(A)-RNA in Prokaryoten

Nach der Entdeckung von poly(A)-Sequenzen in eukaryotischer und viraler mRNA Anfang der 70er Jahre wurden ähnliche Untersuchungen an prokaryotischer mRNA durchgeführt. Erste Untersuchungen der E. coli-RNA wiesen auf das Fehlen solcher Sequenzen hin (Perry et al., 1972), obwohl die Isolierung und Charakterisierung einer Poly(A)-Polymerase aus E. coli schon lange vorher bekannt war (August et al., 1961). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vorerst angenommen, daß die Polyadenylierung von mRNA ein charakteristisches Unterscheidungsmerkmal im Entwicklungsprozeß zwischen Prokaryoten und Eukaryoten darstellt (Perlman et al., 1973).

Die prinzipielle Schwierigkeit bei der Isolierung und Charakterisierung von mRNA in Prokaryoten entsteht dadurch, daß mRNA eine viel kürzere Lebenszeit (im Durchschnitt unter 2 Minuten) als die überwiegende Mehrheit der eukaryotischen mRNAs hat. Bei Prokaryoten, wo keine Zellkompartimentierung vorhanden ist, sind Transkription der mRNA und deren Translation an den Ribosomen zwei miteinander gekoppelte Vorgänge; sobald das 5'-Ende der mRNA nicht mehr durch die Ribosomenstruktur geschützt ist, kann es von 5'-Exonucleasen abgebaut werden.

1975 berichteten fast zur selben Zeit drei verschiedene Arbeitsgruppen über die Bestimmung und Charakterisierung von poly(A)-RNA in den gramnegativen Bakterien E. coli (Nakazato et al., 1975; Srinivasan et al., 1975) und Caulobacter crescentus (Ohta et al., 1975). Daraufhin folgte in den letzten Jahren eine Vielzahl von Arbeiten, die das Auftreten von poly(A)-Sequenzen in unterschiedlichen prokaryotischen Systemen feststellen (eine tabellarische Zusammenfassung der bisherigen Ergebnisse erfolgt im Diskussions- teil dieser Arbeit).

Widersprüchliche Ergebnisse liegen zur Frage vor, ob die Polyadenylierung von RNA in grampositiven Bakterien mit bestimmten Differenzierungsprozessen zu Beginn der Sporulation in Zusammenhang steht.

Ein Teil der bisherigen Untersuchungen deutet darauf hin, daß nur

in der stationären Phase im Übergang zur Sporulation von Bacillus subtilis (Kerjan und Szulmajster, 1980) und von Bacillus polymixa (Kaur und Jayaraman, 1979) höhere Anteile (12-20 %) der pulsmarkierten RNA polyadenyliert werden, während exponentiell wachsende Zellen einen wesentlich niedrigeren poly(A)-RNA-Gehalt (0,6-4 %) zeigen. Untersuchungen mit sporulationsdefekten Mutanten von B. polymixa (Jayaraman und Murthy, 1982) zeigen, daß nur solche, die im Bereich der "frühen" Sporulationsgene (sogenannte spoO-Mutanten) defekt sind, keine Stimulierung des poly(A)-Gehalts in der stationären Wachstumsphase aufweisen. Mutanten, die im Bereich "späterer" Sporulationsereignisse (spoII- und spoIV-Mutanten) defekt sind, zeigen eine ähnliche Zunahme des poly(A)-RNA-Gehalts zu Beginn der stationären Wachstumsphase wie der Wildtyp.

Daraus leiten die Autoren die Annahme ab, daß die Polyadenylierung ein Phänomen der frühen Sporulationsphase darstellt. Diese Ergebnisse werden jedoch durch andere Arbeiten (Graef-Dodds und Chambliss, 1978; Gopalakrishna et al., 1981; Gopalakrishna und Sarkar, 1982a) in Frage gestellt, die keinen Zusammenhang zwischen der Wachstumsphase von B. subtilis und dem Auftreten von polyadenylierter RNA feststellen können.

Zwei B. brevis-Stämme wurden bisher - neben dem in dieser Arbeit beschriebenen Stamm ATCC 9999 - auf ihren poly(A)-Gehalt untersucht: Stamm ATCC 8185 (Sarkar et al., 1978; Gopalakrishna et al., 1981) und Stamm 47 (Hussain et al., 1982).

Die einzelnen B. brevis-Stämme haben recht unterschiedliche molekularbiologische Eigenschaften, auch wenn sie morphologisch unter dem Mikroskop nicht zu unterscheiden sind. Sie zeigen so ein recht unterschiedliches Verhalten im Sekundärmetabolismus, im Zellwandaufbau und im Differenzierungsprozeß während der Sporulation.

Besonders interessant sind die bisher erzielten Ergebnisse bei den Untersuchungen der poly(A)-RNA des Stamms 47. Dieser Stamm produziert bei optimalen Wachstumsbedingungen bis zu 12 g Pro-

tein/1, die in der frühen stationären Phase in das Medium ausgeschieden werden (die bisher höchste bekannte Proteinsekretionsmenge bei einem Mikroorganismus). Bei den ausgeschiedenen Proteinen handelt es sich um zwei Komponenten der äußeren Zellwandschicht (mit einem Molekulargewicht von je ca. 130.000 und 150.000 Dalton), die in der Übergangsphase zur Sporulation im Zusammenhang mit einer sich verändernden Zellwandstruktur in das Medium abgegeben werden (Yamada et al., 1981). Die pulsmarkierte RNA dieses Stammes zeigt den bisher höchsten Gehalt an poly(A)-RNA bei Prokaryoten, nämlich ca. 50 %. Eine Mutante des Stammes 47, die nur wenig Protein in der frühen stationären Phase in das Medium sekretiert, enthält im Vergleich zum Wildtyp nur 20 % poly(A)-RNA. Aus diesem Befund und aus der Tatsache, daß gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase verstärkt polyadenylierte RNA zu finden ist, leiten die Autoren (Hussain et al., 1982) einen Zusammenhang zwischen der Produktion der sekretierten Proteine und der poly(A)-RNA ab.

Leider gelang bisher nicht die in-vitro-Translation der isolierten poly(A)-RNA in einem zellfreien System, was der direkte Beweis dafür wäre, daß es sich auch tatsächlich um die entsprechende polyadenylierte mRNA handelt, die für die sekretorischen Proteine codiert.

Die einzige Darstellung der in-vitro-Translationsprodukte prokaryotischer polyadenylierter mRNA gelang bisher mit Hilfe eines S-30 Weizenkeimextraktes durch Übersetzung der poly(A)-RNA aus Rhodospirillum rubrum (Majumdar und Vipparti, 1980), eines fakultativ phototropen Bakteriums. Aus den Translationsexperimenten geht hervor, daß eine Vielzahl von mRNAs aus dem Organismus polyadenyliert werden.

Zusammenfassend kann man aus den bisherigen Untersuchungen schließen, daß die Polyadenylierung von RNA auch in Prokaryoten verbreitet ist, wenn auch der relative Anteil der polyadenylierten RNA geringer und die Durchschnittslänge der poly(A)-Sequenzen (mit wenigen Ausnahmen) kleiner ist als bei höheren Lebewe-

sen (sie beträgt bei Säugetieren 150 bis 200 Nukleotiden), sie liegt aber durchaus in der Größenordnung der poly(A)-Sequenzen von RNA niederer Eukaryoten wie Hefen und Einzellern (siehe dazu den Übersichtsartikel von Carlin, 1980).

Die Polyadenylierung von prokaryotischer RNA ist sicher kein sporulationsspezifischer Vorgang grampositiver Bakterien (auch RNA gramnegativer Bakterien wie E. coli wird polyadenyliert), auch wenn im Differenzierungsprozeß einiger bisher untersuchter Bazillenarten zu Beginn der stationären Wachstumsphase eine Zunahme des poly(A)-Gehalts festzustellen ist.

3. MATERIALIEN UND METHODEN

3.1 Abkürzungen

Ado	Adenosin
AMP	Adenosin-5'-Monophosphat
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
BSA	Rinderserumalbumin
cpm	Zählungen pro Minute
DNA	Desoxyribonucleinsäure
DTE	Dithioerythritol
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGTA	Äthylenglykol-bis(β -aminoäthylether)N,N'-tetraessigsäure
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
LiDS	Lithiumdodecylsulfat
mRNA	Messenger-Ribonucleinsäure
OD	Optische Dichte
PEI	Polyäthylenimin
poly(A)	Polyadenylsäure
poly(U)	Polyuridylsäure
POP	2,5- Diphenyloxazol
RNA	Ribonucleinsäure
rRNA	ribosomale Ribonucleinsäure
SDS	Sodiumdodecylsulfat
TCA	Trichloressigsäure
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA	Transfer-Ribonucleinsäure
Upm	Umdrehungen pro Minute
Urd	Uridin
UVLicht	Ultraviolette Licht
v/v	Volumenprozent
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtprozent pro Volumeneinheit

3.2 Chemikalien und Enzyme

Acrylamid	Serva
Adenosin, AMP, ATP	Boehringer, Mannheim
[2,8 - ^3H]-Adenosin	New England Nuclear
[^{14}C]-AMP	Amersham
N,N'-Bisacrylamid (reinst)	Serva
Cellulosefolie	Schleicher und Schüll
Coomassie Blue G-250	Serva
DTE	Sigma
EGTA	Sigma
[^3H]-Enhancer	New England Nuclear
Glasfiberfilter GF 92	Schleicher und Schüll
GTP	Boehringer, Mannheim
Harnstoff	Serva
Heparin	Sigma
LiCl	Serva
LiDS	Serva
MS 2-Phagenmessenger	Boehringer, Mannheim
Oligo(dT)-Cellulose	Bethesda Research Lab.
Omnifluor	New England Nuclear
PEI-Cellulosefolie	Schleicher und Schüll
Phosphoenolpyruvat	Boehringer, Mannheim
Polyadenylsäure	Sigma
Poly(A)-Marker ($\overline{146}$, $\overline{95}$, $\overline{74}$, $\overline{23}$)	Miles
Polyuridylsäure	Sigma
[5,6 - ^3H]-Polyuridylsäure	New England Nuclear
Poly(U)-Sepharose	Sigma
Protein-Molekulargewichts- marker	Pharmacia
Protosol ("tissue solubilizer")	New England Nuclear
tRNA aus E. coli	Paesel
[5,6 - ^3H]-Uridin	New England Nuclear
L-[^{14}C]-Valin	Amersham

Enzyme

Alkalische Phosphatase	Sigma
DNase I	Boehringer, Mannheim
Phosphoenolpyruvatkinase	Boehringer, Mannheim
Proteinase K	Boehringer, Mannheim
RNase A, T ₁	Sigma
Schlangengift-Phospho- diesterase	Sigma

Alle anderen verwendeten Chemikalien wurden von der Fa. Merck bezogen.

3.3 MedienGlutaminatmedium

1 % Na-L-Glutaminat, 0,25 % Difco-Yeast Extrakt, 0,2 % $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0,1 % KH_2PO_4 , 0,013 % CaCl_2 , 0,0165 % MgSO_4 , 5×10^{-4} % FeSO_4 , 5×10^{-4} % CoCl_2 , 5×10^{-4} % MnCl_2 . Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt. Die KH_2PO_4 -Lösung (10 %-Stammlösung) muß extra autoklaviert und erst nach Abkühlen dem restlichen Medium zugegeben werden, sonst bildet sich ein unlöslicher Niederschlag.

Hanson-Medium

0,3 % Difco-Fleischextrakt, 0,5 % Polypeptone, 0,014 % CaCl_2 , 0,085 % MgSO_4 , 0,1 % KCl, 0,1 % Glucose. Der pH-Wert wird auf 7,2 eingestellt (siehe auch Hanson et al., 1964).

Vollmedium

1 % Difco-Bactopeptone, 0,5 % Difco-Yeast Extrakt, 0,5 % NaCl, 0,2 % Glucose.

3.4 Stämme

Bacillus brevis, Stamm ATCC 9999
Escherichia coli, Stamm D-10

3.5 Puffer

3.5.1 Präparation von gesamtzellulärer RNA

Zellenwaschpuffer: 0,1 M Na-acetat, pH 5,5
 0,5 M NaCl
 25 mM NaCl

A. LiCl/Harnstoff-Methode

Homogenisationspuffer: 6 M Harnstoff
 0,1 M Na-acetat, pH 5,5
 1 mM EDTA

Fällungspuffer: 6 M Harnstoff
 4,5 M LiCl
 0,1 M Na-acetat, pH 5,5
 1 mM EDTA

B. Phenolextraktionsmethode

Aufschlußpuffer: 10 mM Tris-HCl, pH 7,6 bzw. 9,0
 10 mM LiCl
 1 mM MgCl₂

3.5.2 Präparation von Polyribosomen

Aufschlußpuffer: 30 mM Tris-HCl, pH 7,8
 40 mM Mg(OAc)₂
 40 mM NH₄Cl
 2 mM EDTA
 2 mM DTE
 1 mg/ml Heparin
 20 mM EGTA

Aufbewahrungspuffer: 30 mM Tris-HCl, pH 7,8
 80 mM NH₄Cl
 10 mM Mg(OAc)₂
 2 mM DTE
 10 % Glycerin

3.5.3 Ultrazentrifugation im Sucrosegradienten

Salzpuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
	300 mM NaCl
	20 mM EDTA
Sedimentationsanalyse von Polyribosomen:	30 mM Tris-HCl, pH 7,8
	50 mM KCl
	10 mM Mg(OAc) ₂
	2 mM DTE

3.5.4 Reinigung von poly(A)-RNA über oligo(dT)-Cellulose

Bindungspuffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	500 mM NaCl
	5 mM EDTA
	0,2 % SDS
Waschpuffer:	10 mM Tris-HCl, pH 7,5
	500 mM NaCl

3.5.5 Bestimmung der Poly(A)-Kettenlänge

Gelelektrophorese-Puffer:	40 mM Tris-Acetat, pH 8,0
	20 mM Na-acetat
	0,2 % SDS

3.5.6 Präparation der zellfreien Extrakte S-150 und S-30 Extrakt

Präparationspuffer:	20 mM Tris-HCl, pH 7,5
	12 mM MgCl ₂
	100 mM NH ₄ Cl
	4 mM Mercaptoäthanol

3.5.7 Polyacrylamid-Gelelektrophorese der in-vitro-Translationsprodukte

Gelelektrophorese-Puffer:	25 mM Tris
	192 mM Glycin
	0,1 % SDS
Proben-Puffer:	62,5 mM Tris-HCl, pH 6,8
	2 % SDS
	10 % Glycerin
	5 % Mercaptoäthanol

3.6 Anzucht von Zellen

Zur Anzucht von B. brevis werden 150 ml Medium (in 500 ml-Erlenmeyer-Kolben) mit Übernachtskulturen im Verhältnis 1:100 beimpft. Die Zellen wachsen bei 37°C im Wasserbadschüttler unter starkem Schütteln.

Zellanzuchten im größeren Maßstab (vor allem zur Präparation von zellfreien Extrakten aus B. brevis und E. coli sowie Polyribosomen aus B. brevis werden in einem 12 L-Microferm-Fermentor (New Brunswick Scientific Co. Inc.) durchgeführt.

Zur Präparation des S-30 zellfreien Extraktes wird E. coli D-10 in Vollmedium angezogen. Die Anzucht von B. brevis erfolgt, wenn nicht anders beschrieben, in Glutaminatmedium.

Die Zellen aus der gewünschten Wachstumsphase werden durch schnelles Abkühlen auf 4°C und Abzentrifugieren im Wachstum gehemmt. Anschließend werden die Zellen mit eiskaltem Puffer gewaschen (200 ml/g Zellen; für gesamtzelluläre RNA nimmt man Waschpuffer, für Polyribosomen Aufschlußpuffer).

3.7 In-vivo-Markierung von Zellen mit ^3H -Adenosin oder ^3H -Uridin

20 ml Zellkultur aus der gewünschten Wachstumsphase werden mit 200 μCi ^3H -Adenosin (spez. Aktivität = 31,0 Ci/mMol) oder

^3H -Uridin (spez. Aktivität = 23,8 Ci/mMol) während einer Minute bei 37°C unter Schütteln inkubiert (bei Zellen aus der t_3 -Phase wird die Markierung während 20 Minuten durchgeführt).

Die Markierungszeit der Zellen wird durch Zugabe des 10-fachen Volumens an eiskaltem Waschpuffer (für die gesamtzelluläre RNA) bzw. Aufschlußpuffer (für die Polyribosomen) und sofortigem Abzentrifugieren bei 4°C gestoppt.

Die Aufnahme an radioaktivem ^3H -Adenosin bzw. ^3H -Uridin wird durch Szintillationsmessung eines Aliquots der gewaschenen Zellen auf einem getrockneten Glasfilter unter Zugabe von 5 ml Omnifluor gemessen.

3.8 Präparation von gesamtzellulärer RNA

LiCl-Harnstoff-Methode

Ca. 1 g (Naßgewicht) gewaschene Zellen werden in 20-fachem Volumen Homogenisationspuffer suspendiert und bei 4°C mit Hilfe der French Press (bei 8.000 lb/in²) aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wird 30 Minuten bei 12.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wird vorsichtig abdekantiert und mit dem gleichen Volumen an Fällungspuffer versetzt. Die SDS-Konzentration wird auf 0,05 % eingestellt. Die RNA-Fällung erfolgt über Nacht bei 4°C. Das Präzipitat wird nach kurzer Zentrifugation in 5 ml 0,1 M Na-acetat, pH 5,5, aufgenommen und 4 x mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1) extrahiert. Die RNA, die sich in der wässrigen Phase befindet, wird durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens 96 % Äthanol mindestens 2 Stunden bei -80°C gefällt. Der entstehende Niederschlag wird nach Zentrifugation kurz zur Entfernung von Alkoholresten lyophilisiert und anschließend in 1 ml bidest. Wasser aufgelöst.

Phenol-Extraktionsmethode

Ca. 1 g gewaschene Zellen werden in 20-fachem Volumen Aufschlußpuffer suspendiert und mit Hilfe der French Press (bei 4°C; 8.000 lb/in²) aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wird 30 Minuten bei 12.000 x g abzentrifugiert. Der Überstand wird auf 0,5 % LiDS-Endkonzentration eingestellt, der pH-Wert mit 1 M Tris-

Stammlösung (100 mM Endkonzentration) auf pH 7,6 bzw. 9,0 eingestellt. Die wässrige Phase wird mit dem gleichen Volumen Phenol (frisch destilliert und wassergesättigt) 3 x extrahiert. Die phenolischen und Interphasen werden zusammengegeben und 1 x mit 10 ml 100 mM Tris-HCl (pH 7,6 bzw. 9,0) reextrahiert. Die gesamten wässrigen Phasen werden zum Schluß mit dem gleichen Volumen Phenol extrahiert, anschließend 2 x mit dem gleichen Volumen Chloroform/Isoamylalkohol (24:1), um Phenolreste aus der wässrigen Phase zu entfernen.

Die wässrige Phase wird auf 0,1 M NaCl eingestellt und mit dem 2,5-fachen Volumen 96 % Äthanol mindestens 2 Stunden bei -80°C gefällt. Der RNA-Niederschlag wird kurz lyophilisiert und in 2 ml bidest. Wasser aufgenommen.

Die Ausbeute an gesamtzellulärer RNA wird durch photometrische Messung bei 260 nm bestimmt, dabei sollte das Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,8 und 2,0 liegen. Für die weiteren Berechnungen wird angenommen, daß 1 A_{260} -Unit 40 μg RNA entspricht (Clark und Switzer, 1977).

3.9 Präparation von Polyribosomen

Die gewaschenen Zellen werden in Aufschlußpuffer (3 ml/g Zellen) suspendiert und mit Hilfe der French Press (bei 4°C und 8.000 lb/in²) aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wird auf eine Endkonzentration von 1 % Na-deoxycholat (10 %(w/v)-ige Stammlösung in 30 mM Tris-HCl, pH 7,5) eingestellt und 10 Minuten bei 4°C gerührt. Anschließend wird das Homogenat 20 Minuten bei 18.000 x g zentrifugiert, der Überstand vorsichtig über einem 60 %(w/v)-igen Sucrose"Kissen" (7 ml, gelöst in Aufschlußpuffer) in einem Ti-60-Röhrchen (25 ml Volumen) bis zum oberen Rand geschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgt bei 25.000 Upm 16 Stunden in einem Ti-60-Festwinkelrotor. Die Polyribosomen, die am Boden des Röhrchens sedimentieren, werden vom Rest des Zellsaftes durch Abdekantieren getrennt und in 500-1.000 μl Aufbewahrungspuffer aufgenommen. In diesem Puffer können die Polyribosomen bei -80°C

stabil (über mehrere Wochen) aufbewahrt werden.

Die Polyribosomenausbeute erfolgt durch photometrische Bestimmungen bei 260 nm, dabei sollte das Verhältnis A_{260}/A_{280} zwischen 1,7 und 1,8 liegen. Für die weiteren Berechnungen wird angenommen, daß 1 A_{260} -Unit 35 μg RNA entspricht (Clark und Switzer, 1977).

3.10 Bestimmung des poly(A)-Gehalts durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U)

Der Test wird nach der von Jeffery und Brawerman (1974) beschriebenen Methode durchgeführt.

Alle RNA-Proben (Polyribosomen, gesamtzelluläre RNA, poly(A)-RNA oder nicht-poly(A)-haltige RNA) werden mit Bindungspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, 0,2 % SDS) auf ein Endvolumen von 300 μl eingestellt. Die Polyribosomen werden vorher 10 Minuten bei 37°C mit 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Proteinase K behandelt, um den Proteinanteil der Ribosomen zu zerstören.

Die RNA-Proben werden 30 Minuten bei 30°C unter hohen Salzbedingungen mit jeweils 0,1 μCi ^3H -poly(U)) hybridisiert, dessen spez. Aktivität je nach RNA-Probe zwischen 70 cpm/ng und 1.400 cpm/ng poly(U) (verdünnt mit nicht-radioaktiver poly(U)-Säure) liegt. Anschließend werden die RNA-Proben mit 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ RNase A 15 Minuten bei 30°C verdaut, um nicht-hybridisiertes radioaktives poly(U) abzubauen. Durch Zugabe von TCA (Endkonzentration 2,5 %) wird die Reaktion beendet und das hybridisierte Material ausgefällt. Zur quantitativen Fällung gibt man vor der Zugabe von TCA 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ tRNA als Fällungscarrier zu. Die Fällungszeit bei 4°C soll nicht länger als 5 Minuten dauern, da sonst ein Teil des hybridisierten poly(U)'s durch die Einwirkung der TCA abgebaut wird (Williams und Klett, 1978). Das gefällte Material wird über Glasfaserfilter von dem restlichen Material in der Lösung getrennt. Die Filter werden mit 2,5 %iger TCA und 96 %igem Äthanol nachgewaschen. Nach 15 Minuten Trocknen bei 110°C werden die Filter mit 5 ml Szintillationsmix (Omnifluor) im Szintillationszähler gemessen.

Zur Bestimmung der hybridisierten poly(A)-Menge im entsprechenden poly(U)-Konzentrationsbereich werden Eichkurven mit bekannten poly(A)-Mengen im Bereich 5 bis 50 ng und 50 bis 1.000 ng poly(A) aufgenommen (siehe Abb. 3.1).

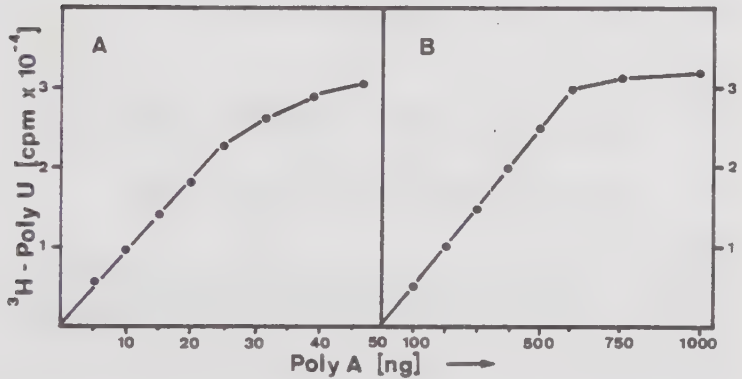


Abb. 3.1 Eichkurven zur Bestimmung der poly(A)-Menge, die mit ³H-poly(U) hybridisiert.

3.11 Reinigung von poly(A)-RNA über oligo(dT)-Cellulose

Die zu reinigende RNA-Fraktion wird in Bindungspuffer (siehe 3.1.5.4) aufgenommen; dabei soll die Endkonzentration nicht 50 Units/ml überschreiten. Anschließend wird die RNA-Probe 5 Minuten bei 60°C behandelt, schnell auf Zimmertemperatur abgekühlt und über eine 1 ml oligo(dT)-Cellulose-Säule (Bindungskapazität 40 Units poly(A)/g Trockenmasse) mit einer Durchflußrate von maximal 20 ml/Stunde gegeben. Die beim ersten Durchlauf nicht an die Matrix bindende RNA wird ein zweites Mal über die Säule gegeben (um eventuell noch vorhandene poly(A)-RNA zu binden). Unspezifisch bindende RNA wird so lange von der Matrix gespült, bis keine opt. Absorption bei 260 nm mehr im Durchfluß meßbar

ist. Die gebundene poly(A)-RNA wird mit bidestilliertem Wasser von der Affinitätssäule abgelöst. Die Ausbeute an polyadenylierter RNA wird durch optische Messung bei 260 nm oder (im Fall von radioaktiv-markierter RNA) durch Szintillationsmessung eines Aliquots bestimmt.

Zur Konzentration und Lagerung wird die poly(A)-RNA in Anwesenheit von E. coli-tRNA (500 µg/ml) als Fällungscarrier in 0,1 M Na-acetat, pH 5,5, durch Zugabe des 2,5-fachen Volumens 96 %igem Äthanol gefällt und bei -20°C gelagert.

3.12 Untersuchungen durch Ultrazentrifugation

3.12.1 Sedimentationsanalyse der Polyribosomen

Ca. 5 Units Polyribosomen werden in 100 µl Puffer (siehe 3.1.5.3) aufgenommen und auf einen 10-30 %igen (w/v) Sucrosegradienten (im selben Puffer, 12 ml Endvolumen) aufgetragen. Die Ultrazentrifugation wird während 100 Minuten bei 39.000 Upm in einem Schwingrotor SW-41 durchgeführt. Anschließend wird der Gradient mit Hilfe einer Schlauchpumpe vom Boden ab kontinuierlich durch eine Meßküvette gepumpt und die opt. Absorption bei 260 nm mit Hilfe eines Spektralphotometers (Gilford) gemessen.

3.12.2 Charakterisierung der RNA durch Ultrazentrifugation

Die unterschiedlichen RNA-Proben (Polyribosomen, gesamtzelluläre RNA, poly(A)-RNA oder nicht poly(A)-haltige RNA) werden mit hohem Salzpuffer auf ein Endvolumen von 100 µl eingestellt. Die Polyribosomen werden vorher mit Proteinase K desintegriert (siehe 3.2.4).

Die RNA-Proben werden 15 Stunden bei 25.000 Upm in einem 5-20(w/v) %igen Sucrosegradienten (gelöst in hohem Salzpuffer, 12 ml Volumen) in einem Schwingrotor SW-41 ultrazentrifugiert. Anschließend wird der Gradient mit Hilfe einer Schlauchpumpe fraktioniert (ca. 30 Fraktionen à 400 µl), die Radioaktivitätsverteilung durch Szintillationsmessung der einzelnen Fraktionen bestimmt oder (bei nicht radioaktiv markierter RNA) der poly(A)-

Gehalt durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U) gemessen.

3.13 Präparation von poly(A)-Segmenten durch Verdauung mit RNase A und T_1

^3H -Adenosin pulsmarkierte poly(A)-RNA, gereinigt über oligo(dT)-Cellulose (siehe 3.2.6), wird in 10 mM Tris-HCl, pH 7,5, 500 mM NaCl, 5 mM EDTA, aufgenommen und mit 20 μg RNase A pro ml oder/und 10 Units RNase T_1 pro ml 20 Minuten bei 30°C verdaut. Anschließend werden die poly(A)-Segmente über oligo(dT)-Cellulose getrennt, die mit bidest. Wasser eluierten poly(A)-Segmente mit 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ nicht radioaktivem poly(A) als Carrier vermischt und die Proben bis zur Trocknung unter Vakuum eingedampft.

3.14 Bestimmung der Position der poly(A)-Segmente durch Verdauung mit Schlangengift-Phosphodiesterase

Die lyophilisierten poly(A)-Segmente werden in 100 μl 100 mM Tris-HCl, pH 8,5, 8 mM MgCl_2 , aufgenommen. Jeweils 10 μl werden 1 Stunde bei 40°C in Anwesenheit von Schlangengift-Phosphodiesterase mit (5 μg) oder ohne alkalische Phosphatase inkubiert. Nach Zugabe von 1 μl 25 mM 5'-AMP als Carrier werden die Proben auf Polyäthylenimin-Cellulose-Folie (mit Fluoreszenzindikator) aufgetragen, als Laufmittel für die Chromatographie wird 1,2 M LiCl verwendet. Die Position von AMP und Adenosin im Chromatogramm wird unter der UV-Lampe detektiert, Oligonucleotide bleiben am Start liegen. Die entsprechenden Banden werden aus der PEI-Cellulose-Folie ausgekratzt, in 1 ml 1,2 M LiCl suspendiert und in 10 ml Bray's Solution (Szintillator für wässrige Medien) die Radioaktivitätsverteilung gemessen.

Aus dem Verhältnis der Radioaktivität am Start des Chromatogramms zu der Radioaktivität in der AMP bzw. Adenosin-Bande wird der Anteil der nicht verdauten poly(A)-Segmente abgeschätzt.

3.15 Alkalische Hydrolyse der poly(A)-Segmente

Lyophilisierte poly(A)-Segmente (siehe 3.2.8) werden in 50 μ l 0,3 N NaOH 15 Stunden bei 37°C hydrolisiert, mit H_3BO_3 auf pH 9,2 eingestellt und bis zur Trocknung unter Vakuum eingengt. Die hydrolisierten Proben werden in 20 μ l einer 2 mM-Lösung Adenosin und AMP aufgelöst und auf Cellulosefolie, die vorher mit 0,1 M Na-borat, pH 9,2, durchtränkt wurde, aufgetragen. Als Referenz werden je 1 μCi ^3H -Adenosin und ^{14}C -AMP mit aufgetragen, Bromphenolblau zeigt die Leitfront der Ionen während der Elektrophorese an, die bei 800 Volt 60 Minuten beträgt. Dabei wandert AMP 12,6 cm, Adenosin 4,8 cm. Die entsprechenden Elektrophoresebahnen der Cellulosefolie werden in 1 cm Abstand ausgekratzt, in Szintillationsgläsern mit 1 ml bidest. Wasser gegeben und die Radioaktivität nach Zugabe von je 10 ml Bray's Solution ermittelt.

3.16 Bestimmung der poly(A)-Länge durch Polyacrylamid-Gel-elektrophorese

Die lyophilisierten poly(A)-Segmente werden in ca. 30 μ l Gel-elektrophoresepuffer (siehe 3.1.5.5) aufgelöst und nach Zugabe von Bromphenolblau auf ein 10 %iges Polyacrylamidgel aufgetragen. Die Elektrophorese findet bei 150 Volt statt; nachdem der Farbstoff 2/3 der Strecke im Gel (ca. 6,5 cm) gewandert ist, wird die Gelelektrophorese abgebrochen. Die entsprechenden Gelbahnen werden mit einem Gelschneider in 2 mm-Scheiben geschnitten, die Gelscheiben in ein Szintillationsgläsern gegeben und mit 1 ml Gewebeauflösungsmittel ("tissue solubilizer") 2 Stunden bei 50°C behandelt.

Es sollte in diesem Zusammenhang erwähnt werden, daß zur Freisetzung der Radioaktivität in den Gelscheiben Gewebeauflösungsmittel verschiedener Firmen getestet wurden. Besonders bewährt hat sich das Produkt der Firma NEN (unter dem Namen "Protosol"), das nur einen sehr geringen Quench bei der Radioaktivitätszählausbeute zeigt.

Nach Inkubation der Gelscheiben und Abkühlen auf Raumtemperatur werden je 5 ml Szintillationsmix zugegeben und die Radioaktivität durch Szintillationsmessung bestimmt.

Als Eichwerte werden je 0,5 A₂₆₀-Units poly(A)-Marker der Durchschnittsgröße 146, 95, 74 und 23 mit elektrophoretisiert, anschließend mit 0,02 % Toluidinblau (in 10 % Essigsäure) angefärbt und deren Wanderungsstrecke im Gel unter kurzzeitigem UV-Licht gemessen.

3.17 Präparation der zellfreien Extrakte

3.17.1 S-150 Extrakt aus B. brevis (ATCC 9999)

Der S-150 Extrakt wird im wesentlichen nach der von Legault-Démare und Chambliss (1974) beschriebenen Methode durchgeführt. Ca. 10 g (mit Präparationspuffer) gewaschene Zellen aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase werden in 25 ml Präparationspuffer suspendiert und mit Hilfe der French Press (bei 4°C und 8.000 lb/in²) aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wird 15 Minuten bei 4°C mit 2,5 µg/ml DNase I behandelt. Anschließend erfolgt eine Zentrifugation bei 15.000 x g während 20 Minuten. Der Überstand dieser Zentrifugation wird 5 Stunden bei 150.000 x g in einem Ti-60-Festwinkelrotor abzentrifugiert. Der Überstand dieser Zentrifugation (= S-150) wird 2 Stunden bei 4°C gegen 2 x 1 l Präparationspuffer (in 10 % Glycerin) dialysiert. Dabei bildet sich ein unlöslicher Niederschlag, der kurz abzentrifugiert wird. Der S-150 wird in 1 ml-Portionen bei -80°C aufbewahrt. Die Proteinkonzentration beträgt (bestimmt nach Bradford, 1976) 4,5 mg/ml.

3.17.2 S-30 Extrakt aus E. coli D-10

Der E. coli-Stamm D-10 ist eine RNase-arme Mutante, die aufgrund dieser Eigenschaft zur in-vitro-Translation besonders geeignet erscheint.

Ca. 10 g (in Präparationspuffer) gewaschene Zellen aus der frühen exponentiellen Wachstumsphase (abgeerntet bei einer Zell-

dichte von $0,5 \times 10^8$ Zellen/ml) werden in 25 ml Präparationspuffer suspendiert und mit Hilfe der French Press (8.000 lb/in^2) bei 4°C aufgeschlossen. Das Zellhomogenat wird 60 Minuten bei $30.000 \times g$ abzentrifugiert. Die oberen $2/3$ des Zellüberstands werden vorsichtig mit einer Pipette abgehoben und mit $10 \mu\text{g/ml}$ DNase I 5 Minuten bei 37°C behandelt.

Anschließend wird der S-30 Extrakt 45 Minuten bei 30°C in einem Mix inkubiert, der folgende Komponenten enthält: 1 mM ATP, 5 mM Phosphoenolpyruvat, 2 mM Mercaptoäthanol, 250 μM an allen 20 proteinogenen Aminosäuren und $10 \mu\text{g/ml}$ Phosphoenolpyruvat-Kinase. (Diese Präinkubation soll das Ablösen von noch an Ribosomen gebundener mRNA bewirken, sog. "pre-run-off", und damit die endogene Translationsaktivität des Systems herabsetzen.) Nach der Präinkubation wird der S-30 2 x 1 Stunde gegen je 1 l Präparationspuffer (in 10 % Glycerin) dialysiert.

Die Proteinbestimmung des S-30 Extraktes (nach Lowry et al., 1951, und nach Bradford, 1976) beträgt $22,5 \text{ mg/ml}$.

Der S-30 Extrakt wird in 1 ml-Portionen bei -80°C aufbewahrt.

Ein S-30 Extrakt aus Zellen der frühen exponentiellen Wachstumsphase von B. brevis (ATCC 9999) wurde analog zu der hier beschriebenen Methode präpariert.

3.18 Zellfreie in-vitro-Translation

3.18.1 Translation von gesamtzellulärer RNA

Die zu untersuchenden RNA-Proben werden in einem Mix mit folgenden Bestandteilen (Endvolumen $100 \mu\text{l}$) inkubiert:

5,5 mg/ml	(Protein) S-30 Extrakt
50 mM	Tris-HCl, pH 7,8
5 mM	MgCl_2
80 mM	NH_4Cl
1 mM	ATP
20 μM	GTP
5 mM	Phosphoenolpyruvat
1 μg	Phosphoenolpyruvat-Kinase
1,0 mg/ml	tRNA aus <u>E. coli</u>

50 μM	19 (proteinogene) Aminosäuren (alle außer Valin)
17,5 μM	(^{14}C)-Valin (spez. Akt.: 485 cpm/pMol)

Die tatsächliche Mg^{2+} -Konzentration im Test muß um jeweils 2,4 mM erhöht werden, da der zugegebene S-30 Extrakt (20 μl /Test) in 12 mM MgCl_2 gelöst ist.

Die Temperatur und die Inkubationszeit betragen jeweils 37°C und 60 Minuten, falls nicht anders angegeben. Die Reaktion wird durch Zugabe von TCA (10 % (w/v) Endkonzentration) gestoppt. Das präzipitierte Protein wird 10 Minuten gekocht (um radioaktiv markierte tRNA zu deacylieren), nach Abkühlen im Eisbad über Glasfibrerfilter getrennt, die mit 10 % (w/v) iger TCA und Äthanol nachgewaschen werden. Die Filter werden 15 Minuten im Trockenschrank bei 110°C getrocknet, nach Abkühlen werden je 5 ml Omni-fluor zugegeben und die Radioaktivität im Szintillationszähler gemessen.

3.18.2 Translation von Polyribosomen

Der Test erfolgt unter den gleichen Bedingungen wie bei der gesamtzellulären RNA mit folgenden Ausnahmen:

Anstatt des S-30 Extraktes wird 0,45 mg/ml S-150 Extrakt zugesetzt, die MgCl_2 -Konzentration beträgt 6,8 mM statt 5 mM. Die tatsächliche Endkonzentration im Test an Mg^{+2} muß um 1,2 mM korrigiert werden, da der zugegebene S-150 Extrakt (10 μl /Test) 12 mM MgCl_2 enthält.

Die Temperatur und die Inkubationszeit betragen jeweils 37°C und 30 Minuten, falls nicht anders angegeben.

3.19 Analyse der in-vitro-Translationsprodukte

A. Vorbereitung der Proben

Nach stattgefundener in-vitro-Translation wird das ausgefällte Protein im Reagenzglaschen 2 x mit 2 ml 10 % TCA, 2 x mit 2 ml 96 % Äthanol und 1 x mit 2 ml Äthanol-Äther (1:1) gewaschen. Die im Anschluß getrockneten Proteinpellets werden in einem möglichst

kleinen Volumen (10-25 μ l) des Gelelektrophoreseprobenpuffers (siehe 3.1.5.7) aufgenommen. Falls sich das Proteinpellet wegen TCA-Resten in der Probe nicht auflöst, wird zur Neutralisation etwa 1 M Tris-Lösung (pH nicht eingestellt) zugegeben. Im Anschluß werden die Proben 3 Minuten bei 95°C gekocht (zur Zerstörung der Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine), nach Abkühlen der Probe Bromphenolblau (0,001 % Endkonzentration) als Farbstoffmarker für die anschließende Gelelektrophorese zugesetzt.

B. Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese erfolgt in dem von Laemmli (1970) beschriebenen Zweiphasen-Gelsystem, das Sammelgel (pH 6,8) hat dabei eine Endkonzentration an Acrylamid von 4 % (w/v), das Trenngel (pH 8,8) von 12,5 % (w/v).

Die Elektrophoresedauer beträgt ca. 5 Stunden (bei ca. 100 Volt und 40-50 mA Stromstärke). Das Gel wird ca. 30 Minuten in 0,24 % Coomassie Brilliant Blue G-250 (in 50 % Methanol und 10 % Essigsäure) gefärbt, der überschüssige Farbstoff im Gel über Nacht in 30 % Methanol und 10 % Essigsäure entfernt. Durch diese Färbung werden die Proteinbestandteile des S-30 Extraktes sichtbar gemacht (nicht aber die Translationsprodukte, die in einer viel zu geringen Konzentration vorliegen) und damit die erfolgreiche Trennung der Proteinkomponenten überprüft. Zur Molekulargewichtsbestimmung der in-vitro translatierten Produkte werden je ca. 10 μ g Proteinmarker mit bekanntem Molekulargewicht mit elektrophoretisiert.

C. Fluorographische Markierung der Translationsprodukte

Zur besseren Detektion der radioaktiven Proteinbanden wird das Gel nach der von Bonner und Laskey (1974) beschriebenen Methode behandelt. Zuerst wird das Gel 1 Stunde bei Raumtemperatur in ^3H -Enhancer (Firma NEN) inkubiert, der die Fluorophore POP und POPOP enthält. Anschließend wird das Gel 1 Stunde bei Raumtemperatur in bidest. Wasser inkubiert, dabei fallen die Fluorophore

im Gel, das ganz milchig wird, aus. Zum Schluß wird das Gel vorsichtig auf Filterpapier übertragen und bei 80°C unter Vakuum mit Hilfe eines Geltrockners (z.B. der Firma LKB) getrocknet. Das getrocknete Gel wird auf einen Röntgenfilm (Firma Agfa) gelegt, ca. 10 Tage bei -80°C inkubiert und anschließend entwickelt.

4. ERGEBNISSE

Zur Bestimmung und Charakterisierung von poly(A)-RNA in Abhängigkeit der Wachstumsphase von B. brevis (ATCC 9999) wird in dieser Arbeit die in der Literatur weit verbreitete Methode der in-vivo-Pulsmarkierung von Zellen mit radioaktiven RNA-Vorstufen wie ^3H -Adenosin oder ^3H -Uridin angewandt. Nach Präparation der radioaktiv pulsmarkierten RNA (Gesamt-RNA oder Polyribosomen) wird die entsprechende poly(A)-haltige RNA-Fraktion mit Hilfe der Affinitätschromatographie (oligo(dT)-Cellulose) angereichert und ihr Anteil an der gesamten schnell markierten RNA durch Radioaktivitätsmessung bestimmt.

Einige Anmerkungen zu dieser Vorgehensweise sollten in diesem Zusammenhang erfolgen, die die Aussagekraft dieses Meßverfahrens als Bestimmungsmethode des polyadenylierten Messenger-Anteils relativieren:

1. Der Anteil der mRNA an der radioaktiv pulsmarkierten RNA ist trotz kurzer Markierungszeit (unter 5 % der Generationszeit der Zellen) nicht als hundertprozentig anzunehmen, denn auch rRNA und tRNA werden - obwohl in geringerem Maße - radioaktiv markiert.
2. Der Einbau von radioaktivem Adenosin als RNA-Bestandteil erfolgt in höherem Maße in poly(A)-haltiger RNA als in nicht poly(A)-haltiger RNA.
3. RNA mit sehr kurzen poly(A)-Strängen (kürzer als 15 Nukleotide) bindet nicht an die Affinitätsmatrix und wird als Teil der nicht poly(A)-haltigen RNA erfaßt. Trotzdem bietet diese Methode ein gutes qualitatives Maß zur Bestimmung des poly(A)-Gehalts zur Charakterisierung der poly(A)-RNA und zur Abschätzung des Anteils der mRNA, der in der Zelle polyadenyliert wird.

4.1 In-vivo-Markierung von B. brevis-Zellen mit radioaktiven RNA-Vorstufen

Zur Pulsmarkierung von RNA werden Zellen (je 20 ml Kultur, siehe Methodenteil, 3.7) während einer Minute mit radioaktiven RNA-Vorstufen wie ^3H -Adenosin und ^3H -Uridin bei 37°C inkubiert; Zellen aus der stationären Phase (t_3) müssen allerdings während 20 Minuten mit ^3H -Adenosin inkubiert werden, da die Aufnahme in den Zellen sehr gering ist. Die Inkorporationsrate von radioaktiven RNA-Vorstufen wird durch Szintillationsmessung eines Aliquots der Zellen nach der Inkubation bestimmt.

Tabelle 4.1

Aufnahme von ^3H -Adenosin und ^3H -Uridin in Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

Wachstumsphase	Zelldichte (Anzahl der Zellen pro ml Zellkultur) $\times 10^8$	aufgenommene Radioaktivität pro ml Zellkultur (cpm) $\times 10^6$	aufgenommene Radioaktivität pro 10^9 Zellen (cpm) $\times 10^6$
a)			
mid-exponentiell	$1,0 \pm 0,1$	$0,75 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,05$
spät-exponentiell	$4,6 \pm 0,2$	$1,50 \pm 0,2$	$3,26 \pm 0,5$
t_0 -Phase	$6,2 \pm 0,2$	$2,10 \pm 0,2$	$3,38 \pm 0,4$
t_3 -Phase	$6,4 \pm 0,2$	$0,18 \pm 0,05$	$0,28 \pm 0,05$
b)			
mid-exponentiell	$1,5 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,02$	$1,65 \pm 0,1$
t_0 -Phase	$6,2 \pm 0,2$	$0,62 \pm 0,1$	$1,0 \pm 0,15$

a) Markierung mit ^3H -Adenosin, b) Markierung mit ^3H -Uridin

Die hier aufgeführten Werte stellen das statistische Mittel von mindestens drei Experimenten dar. Die Zellen wurden in Glutaminat-Minimalmedium (siehe Methodenteil, 3.3) gezüchtet.

Wie Tab. 4.1 zeigt, findet in der spät-exponentiellen Wachstumsphase eine 4- bis 5-fache Steigerung der Aufnahme von Adenosin gegenüber Zellen aus der mittleren exponentiellen Wachstumsphase statt. Diese erhöhte Aufnahme von Adenosin hält bis zur Beginn

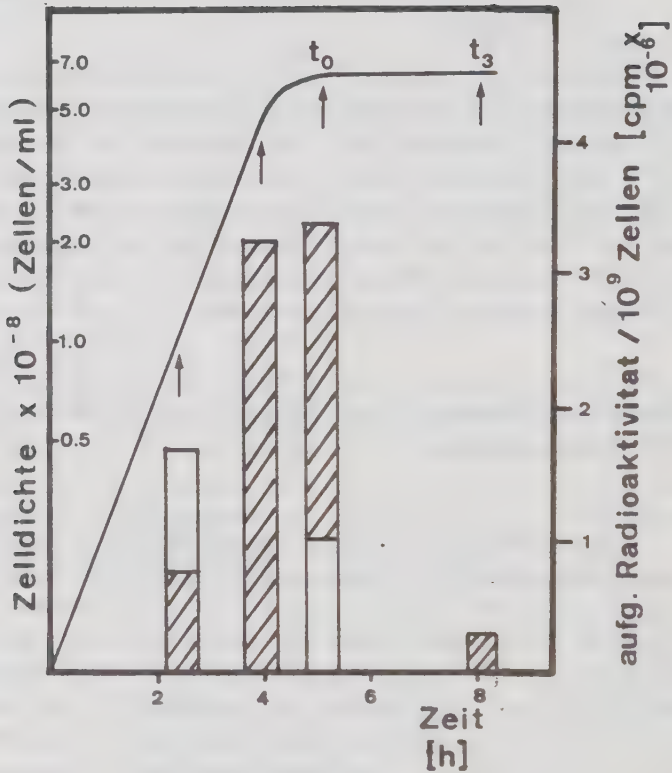


Bild 4.1: Wachstum von B. brevis (ATCC 9999) in Glutaminatmedium und Aufnahme von radioaktiven RNA-Vorstufen.

-  ^3H -Adenosin-Aufnahme
 ^3H -Uridin-Aufnahme

der stationären Phase an, nimmt aber in der stationären Phase (t_3) wieder stark ab. Im Vergleich dazu zeigt sich keine erhöhte Aufnahme von Uridin zu Beginn der stationären Wachstumsphase, sondern eher eine leichte Abnahme. Zur größeren Anschaulichkeit sind in Bild 4.1 die Aufnahmeraten der radioaktiven Vorstufen als Histogramme entlang der Wachstumskurve von B. brevis (ATCC 9999) dargestellt.

Die erhöhte Aufnahme von Adenosin in der späten exponentiellen Wachstumsphase läßt sich nicht leicht interpretieren, zumal parallel dazu keine erhöhte Aufnahme an Uridin festzustellen ist. Offensichtlich ist die erhöhte Aufnahme von Adenosin nicht auf eine Zunahme der Nettosynthese von RNA in dieser Wachstumsphase zurückzuführen.

Wie die folgenden Untersuchungen (Kap. 4.3) zeigen werden, korreliert dieser Effekt mit der verstärkt einsetzenden Polyadenylierung von RNA in B. brevis (ATCC 9999) gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase.

4.2 Optimierung der RNA-Präparationsmethode

Zur Untersuchung des Auftretens von poly(A) in B. brevis (ATCC 9999) wird zuerst eine Präparationsmethode für gesamtzelluläre RNA entwickelt, die es ermöglicht, quantitative Ausbeuten an in-vitro translatierbarer poly(A)-RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen zu erzielen.

Ein erhebliches Problem, das wahrscheinlich bei den ersten Untersuchungen von poly(A)-RNA in Prokaryoten zu negativen Befunden geführt hat, ist die Präparationsmethode von gesamtzellulärer RNA. Es konnte gezeigt werden (Gopalakrishna et al., 1981), daß die Anwendung von Phenolextraktionsschritten bei der Präparation von Gesamt-RNA aus E. coli und B. subtilis zu stark verminderten Ausbeuten an pulsmarkierter poly(A)-haltiger RNA führen. Der Grund für diesen Verlust ist bisher nicht geklärt worden, wahrscheinlich tritt eine starke Wechselwirkung der poly(A)-Segmente mit dem ausgefällten Protein in der Interphase zwischen wässriger und phenolischer Phase ein; dadurch geht ein beträchtlicher Anteil der poly(A)-haltigen RNA während der Präparation verloren. Deshalb wird in den Arbeiten der letzten Jahre zunehmend eine Methode (Sarkar et al., 1978) angewandt, die eine Verdauung des Gesamtproteins nach Zellaufschluß mit Proteinase K in Anwesenheit von RNase-Inhibitoren wie o-Phenantrolin und Heparin beinhaltet; Phenolextraktionsschritte werden dabei vermieden.

Für funktionelle Untersuchungen der poly(A)-RNA, wie z.B. die in-vitro-Translation in einem zellfreien System, ist diese Methode ohne Phenolextraktion nicht zu empfehlen, da schon Spuren an Proteinase K in der gereinigten Gesamt-RNA reichen, um die an der Translation beteiligten Proteine zu zerstören. Deshalb wird in dieser Arbeit eine alternative Präparationsmethode entwickelt, die auf einer Harnstoff/LiCl-RNA-Fällung beruht und keine Phenolextraktion beinhaltet (siehe Methodenteil, 3.8).

Zum Vergleich wird gesamtzelluläre RNA nach einer in der Literatur oft beschriebenen Methode präpariert, die Phenolextraktionsschritte beinhaltet. In Tabelle 4.2 werden die RNA-Ausbeuten aus B. brevis der späten exponentiellen Wachstumsphase miteinander verglichen.

Tabelle 4.2

Vergleich der RNA-Ausbeute und des poly(A)-Gehalts unterschiedlicher Präparationsmethoden

Präparationsmethode	Ausbeute an gesamtzellulärer RNA (pro g Zellen) a) (A ₂₆₀ -Units)	poly(A)-Gehalt pro Unit RNA b) (ng)	rel. poly(A)-Gehalt $\frac{\text{ng poly(A)}}{\text{ng RNA}} \times 100 \%$
LiCl/Harnstoff	450	224,0	0,560
Phenolextraktion bei pH 7,6	520	5,2	0,013
Phenolextraktion bei pH 9,0	540	7,0	0,018

a) Die RNA-Ausbeute wird photometrisch bei 260 nm bestimmt, 1 A₂₆₀-Unit = 40 µg RNA (Clark und Switzer, 1972)

b) Zur Bestimmung des poly(A)-Gehalts durch ³H-poly(U)-Hybridisierung siehe Methodenteil, 3.10.

Die gesamtzelluläre RNA-Ausbeute liegt bei den Präparationen mit Phenolextraktionsschritten zwar etwa 10 % höher, aber der poly(A)-Gehalt der RNA - präpariert nach der LiCl/Harnstoff-Methode - ist erheblich höher. Vergleicht man die in-vitro-Translationsak-

tivität in einem zellfreien S-30 E. coli-System (auf die zellfreie Translation von B. brevis-RNA wird in einem späteren Kapitel, 4.6, eingegangen), so ergibt sich eine 4- bis 5-mal höhere Translationsaktivität der LiCl/Harnstoff-präparierten RNA. Diese Ergebnisse bestätigen den Befund, daß durch die Phenolextraktion ein erheblicher Teil der polyadenylierten RNA verloren geht. Für die folgenden Untersuchungen wird deshalb nur die LiCl/Harnstoff-Präparationsmethode angewandt.

4.3 Charakterisierung der gesamtzellulären poly(A)-RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

4.3.1 Präparation von gesamtzellulärer RNA aus pulsmarkierten Zellen

Die pulsmarkierten Zellen (je 20 ml Kultur, siehe Methodenteil, 3.7) werden mit je 1 g nicht markierten Zellen (Naßgewicht) aus den entsprechenden Wachstumsphasen vermischt und deren gesamtzelluläre RNA nach der optimierten Methode (siehe Methodenteil, 3.8 und Kapitel 4.2) präpariert. Dabei ergeben sich folgende Ausbeuten an radioaktiv pulsmarkierter RNA:

Tabelle 4.3

Ausbeute an radioaktiv pulsmarkierter gesamtzellulärer RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

Wachstumsphase	aufgenommene Radioaktivität pro präparierter Zellmenge (cpm) $\times 10^6$	Ausbeute an radioaktiver gesamtzellulärer RNA (cpm) $\times 10^6$	%	Ausbeute an gesamtzellulärer RNA (pro g Zellen) (A_{260} -Units)
a)				
mid-exponentiell	2,2	$2,1 \pm 0,2$	95,5 %	520 ± 50
spät-exponentiell	24,0	$16,4 \pm 1,5$	68,3 %	450 ± 50
t_0 -Phase	42,0	$23,5 \pm 2,0$	56,0 %	380 ± 40
t_3 -Phase	3,6	$2,3 \pm 0,2$	63,9 %	245 ± 25
b)				
mid-exponentiell	4,95	$4,8 \pm 0,4$	97,0 %	520 ± 50
t_0 -Phase	12,50	$8,5 \pm 0,8$	67,6 %	380 ± 40

a) Markiert mit ^3H -Adenosin b) Markiert mit ^3H -Uridin

Die hier aufgeführten Werte stellen das statistische Mittel von mindestens drei Präparationen dar.

Die höhere Aufnahme an radioaktivem ^3H -Adenosin korreliert mit einer höheren Ausbeute an radioaktiv pulsmarkierter RNA während der späten exponentiellen Wachstumsphase bis zu Beginn des stationären Wachstums am höchsten. Auffallend ist allerdings, daß nur bei den RNA-Präparationen aus mid-exponentiell wachsenden Zellen eine hohe Wiederfindungsrate (mehr als 95 %) der aufgenommenen Radioaktivität durch Einbau in RNA zu finden ist. Es zeigt sich, daß die RNA-Ausbeute (gemessen in A_{260} -Einheiten) von der mid-exponentiellen Phase (520 Einheiten/g Zellen) bis zu t_3 (245 Einheiten/g Zellen) stark abnimmt. Diese Befunde deuten darauf hin, daß vor allem in der stationären Phase eine starke Abnahme des gesamtzellulären RNA-Gehalts durch nukleolytischen Abbau stattfindet und nur ein Teil der in den Zellen aufgenommenen Radioaktivität in der pulsmarkierten RNA vorzufinden ist. Das gleiche Phänomen beobachtet man bei der Präparation von ^3H -Uridin pulsmarkierter RNA.

4.3.2 Anreicherung von pulsmarkierter poly(A)-haltiger RNA durch Affinitätschromatographie

Zur Anreicherung von poly(A)-haltiger RNA verwendet man die Affinitätschromatographie mit Matrizen wie oligo(dT)-Cellulose oder poly(U)-Sephrose. Bei den hier durchgeführten Experimenten wurden keine unterschiedlichen Ergebnisse mit beiden Matrizen festgestellt; bei der Verwendung von oligo(dT)-Cellulose konnten auch keine Unterschiede zwischen einer Anreicherung bei 4°C oder 20°C festgestellt werden; deshalb werden alle folgenden Auftrennungen bei 20°C unter Einsatz von oligo(dT)-Cellulose durchgeführt (für weitere Details siehe Methodenteil, 3.10).

Abbildung 4.2 zeigt - als Beispiel - den Verlauf einer chromatographischen Trennung von poly(A)-haltiger RNA von gesamtzellulären RNA aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase. Das Ergebnis der affinitätschromatographischen Trennung der pulsmarkierten RNA-Proben unterschiedlicher Wachstumsphasen wird in Tabelle 4.4 zusammengefaßt.

Tabelle 4.4

Anreicherung (über oligo(dT)-Cellulose) von poly(A)-haltiger pulsmarkierter RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen

Wachstumsphase	Radioaktivität, eluiert bei hoher Salzkonzentration (cpm) $\times 10^6$	Radioaktivität, eluiert bei niedriger Salzkonzentration (cpm) $\times 10^6$	% (der aufgetragenen cpm)
a)			
mid-exponentiell	1,84	0,21	9,5 %
spät-exponentiell	12,30	3,82	23,3 %
t ₀ -Phase	16,10	7,07	30,1 %
t ₃ -Phase	1,78	0,46	20,2 %
b)			
mid-exponentiell	4,30	0,37	7,8 %
t ₀ -Phase	6,50	0,96	14,7 %

a) Markiert mit ³H-Adenosin b). Markiert mit ³H-Uridin

Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase nimmt der poly(A)-haltige Anteil der ^3H -Adenosin-pulsmarkierten RNA stark zu, erreicht bei t_0 sein Maximum und nimmt dann in der stationären Phase wieder ab. ^3H -Uridin-pulsmarkierte RNA kann auch an die Affinitätsmatrix bei hohen Salzbedingungen gebunden werden, womit sichergestellt ist, daß die gebundene Radioaktivität bei ^3H -Adenosin-markierter RNA nicht einfach Polyadenylsäure ist. Auch bei ^3H -Uridin-markierter RNA zeigt sich dieselbe Tendenz wie bei ^3H -Adenosin-markierter RNA, nämlich ein erhöhter poly(A)-RNA-Gehalt bei t_0 gegenüber der RNA aus exponentiell wachsenden Zellen.

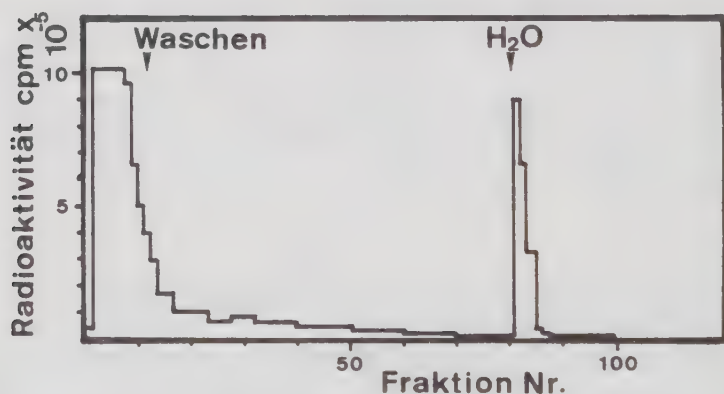


Bild 4.2: Reinigung von poly(A)-RNA aus gesamtzellulärer RNA der spät-exponentiellen Wachstumsphase. Die poly(A)-haltigen RNA-Fractionen werden mit der H_2O -Stufe eluiert (Fraktion 80-85). Jede Fraktion entspricht einem Volumen von ca. 1 ml.

4.3.3 Charakterisierung der pulsmarkierten gesamtzellulären RNA durch Ultrazentrifugation

Zur Charakterisierung werden die angereicherten poly(A)-haltigen pulsmarkierten RNA-Proben der unterschiedlichen Wachstumsphasen einer Ultrazentrifugation im Sucrosegradienten unterworfen und nach Fraktionierung die Radioaktivitätsverteilung gemessen (Abb. 4.3.1 u. 4.3.2). Zum Vergleich wird auch die nicht poly(A)-haltige RNA-Fraktion aus der spät-exponentiellen Phase im Sucrosegradienten dargestellt (Abb. 4.3.3).

Die Sedimentationseigenschaften der poly(A)-RNA pulsmarkierter Zellen aus unterschiedlichen Wachstumsphasen werden in Tabelle 4.5 zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.5

Sedimentationseigenschaften pulsmarkierter poly(A)-RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

Wachstumsphase	Größenverteilung der poly(A)-RNA		
	Maximum der Radioaktivität	Durchschnittsverteilung der Radioaktivität (50 % liegt bei)	70 % der Radioaktivität liegen zwischen
a)			
mid-exponentiell	10 S	10 S	4 S bis 16 S
spät-exponentiell	9 S	9 S - 10 S	4 S bis 16 S
t_0 -Phase	7 S	7 S	4 S bis 10 S
t_3 -Phase	6 S	5 S - 6 S	4 S bis 10 S
b)			
mid-exponentiell	10 S	10 S	4 S bis 16 S
t_0 -Phase	9 S	9 S - 10 S	4 S bis 12 S

a) Markiert mit ^3H -Adenosin b) Markiert mit ^3H -Uridin

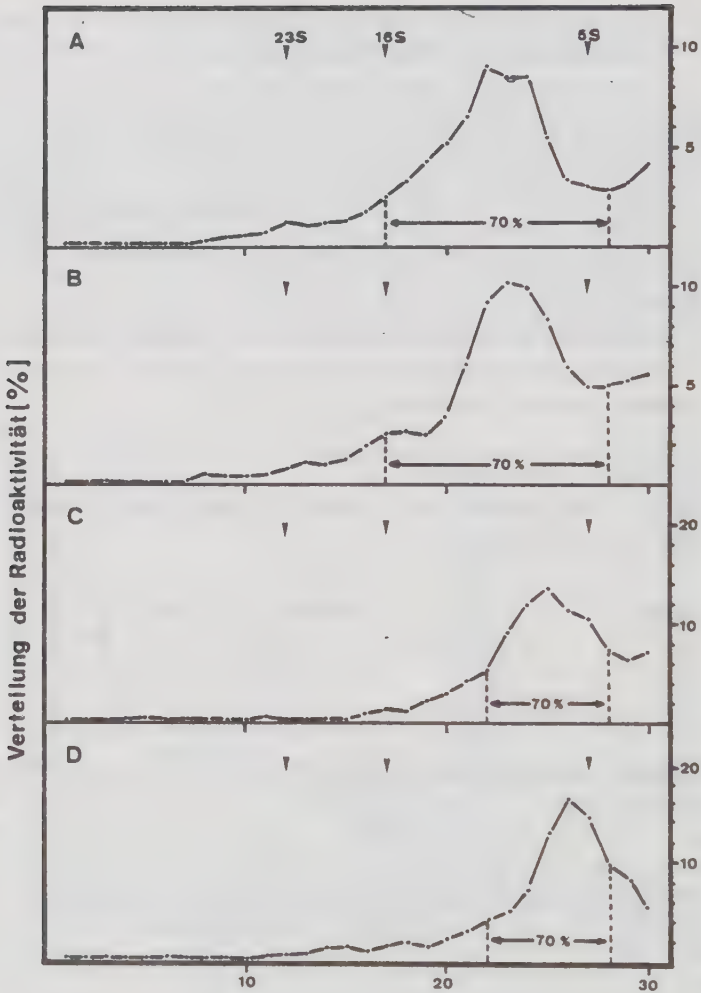


Bild 4.3.1: Sedimentationsverhalten von ^3H -Adenosin-pulsmarkierter poly(A)-RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen (A = Mitte der exponentiellen Wachstumsphase; B = Ende des exponentiellen Wachstums; C = Beginn der stationären Phase; D = t_3 -Phase) (pro Gradient wurden ca. 50.000 cpm aufgetragen)

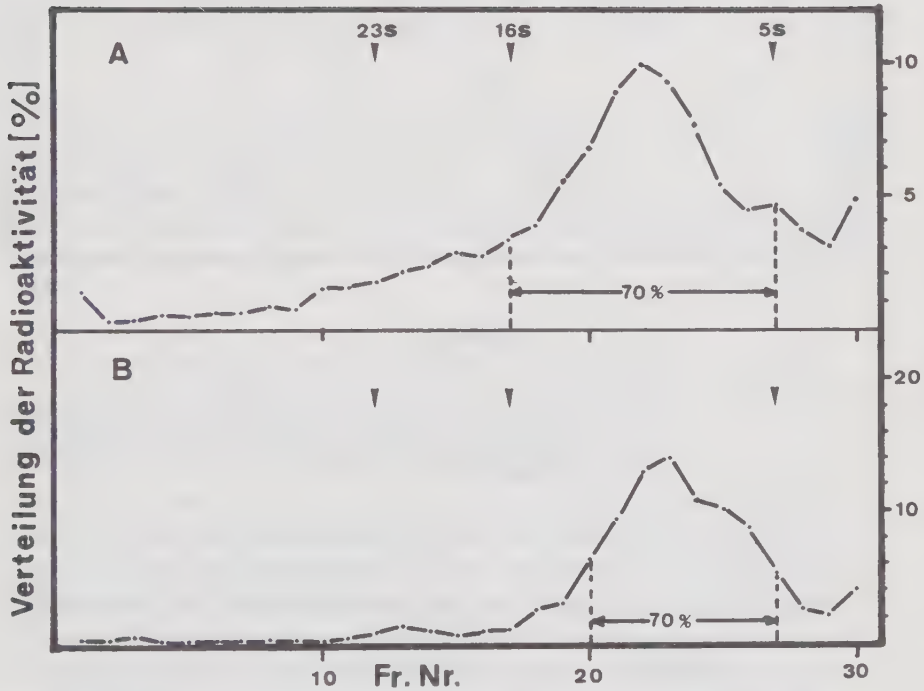


Bild 4.3.2: Sedimentationsverhalten von ^3H -Uridin-pulsmarkierter poly(A)-RNA (A = Mitte der exponentiellen Wachstumsphase; B = Beginn der stationären Phase) (50.000 cpm pro Gradient aufgetragen).

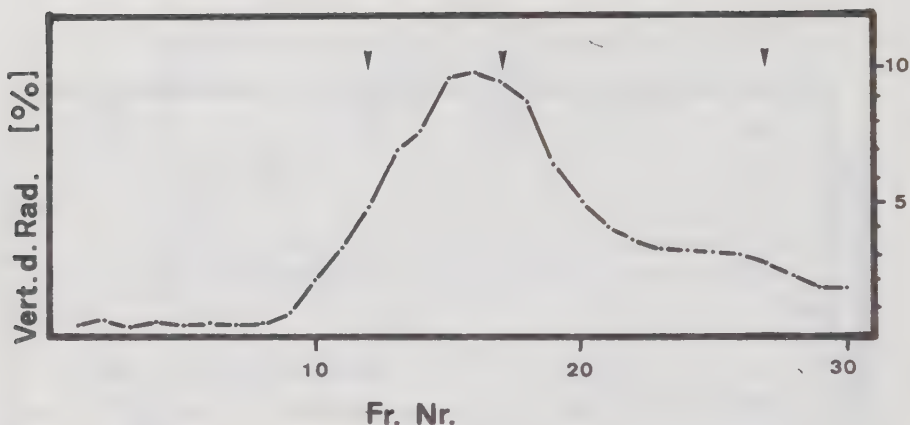


Bild 4.3.3: Sedimentationsverhalten von ^3H -Adenosin-pulsmarkierter nicht poly(A)-haltiger RNA aus der späten exponentiellen Wachstumsphase (50.000 cpm auf Gradienten aufgetragen)

Die Ultrazentrifugation der poly(A)-RNA aus exponentiell wachsenden Zellen zeigt eine polydisperse Größenverteilung zwischen 4 S und 23 S, die Durchschnittsgröße liegt bei 10 S (was einer Größenordnung von 500 - 600 Nukleotiden entspricht). Eine sehr ähnliche Größenverteilung wird bei Markierung der poly(A)-RNA aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase mit ^3H -Adenosin oder mit ^3H -Uridin erzielt. Anders in der t_0 -Phase: hier zeigt die ^3H -Adenosin-markierte poly(A)-RNA eine kleinere Durchschnittsgröße (7 S) im Vergleich zur ^3H -Uridin-markierten (9 S - 10 S), die allerdings im Vergleich zur poly(A)-RNA aus der mid-exponentiellen Phase auch eine gewisse Abnahme der Größenverteilung erfährt. Die unterschiedliche Größenverteilung der ^3H -Adenosin- und ^3H -Uridin-markierten poly(A)-RNA aus der t_0 -Phase bestärkt die Vermutung (siehe 4.3.2), daß ein Teil der poly(A)-haltigen RNA degradiert worden ist. Diese Tendenz zur Degradation scheint sich in der stationären Phase noch zu verstärken: bei t_3 hat die ^3H -Adenosin-markierte poly(A)-RNA nur noch eine Durchschnittsgröße von 5 S - 6 S und 70 % der Radioaktivität sedimentieren zwischen 10 S und 4 S (es muß allerdings

in diesem Zusammenhang nochmals erwähnt werden, daß die Zellen der t_3 -Phase während 20 Minuten markiert werden mußten, um überhaupt eine nennenswerte Inkorporation an ^3H -Adenosin zu erreichen).

Die nicht poly(A)-haltige RNA aus der spät-exponentiellen Wachstumsphase zeigt eine polydisperse Verteilung (Abb. 4.3.3), wobei trotz der kurzen Markierungszeit auch schon ein signifikanter Anteil an ribosomaler RNA (23 S, 16 S) zu erkennen ist.

4.3.4 Einfluß des Wachstumsmediums auf die Polyadenylierung der gesamtzellulären RNA

Um einen möglichen Einfluß des Wachstumsmediums auf die Polyadenylierung von RNA zu untersuchen, werden neben dem Glutaminat-medium, das für die bisher beschriebenen Experimente verwendet wurde, zwei weitere getestet (zur Zusammensetzung der Medien siehe Materialien und Methoden, 3.3). Das Hanson-Medium (Hanson et al., 1964) scheint besonders geeignet zu sein, um die Sporulation bei Bazillen auszulösen. Zellen aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase und zu Beginn der stationären Phase werden in den verschiedenen Medien pulsmarkiert und deren RNA auf poly(A)-Gehalt untersucht.

Tabelle 4.6

Einfluß unterschiedlicher Wachstumsmedien auf den poly(A)-RNA-Gehalt

Wachstumsmedium	Medium	Aufnahme von ^3H -Adenosin (pro 10^9 -Zellen) (cpm) $\times 10^6$	Ausbeute an puls-markierter RNA pro 10^9 -Zellen (cpm) $\times 10^6$	poly(A)-RNA-Gehalt (nach Reinigung Über oligo(dT)-Cellulose (% der cpm))
mid-exponentiell	Glutaminat	0,75	0,73	9,5 %
mid-exponentiell	Vollmedium	0,48	0,40	12,1 %
mid-exponentiell	Hanson-Medium	0,63	0,61	9,7 %
t_0	Glutaminat	3,38	1,90	30,1 %
t_0	Vollmedium	2,70	2,20	28,4 %
t_0	Hanson-Medium	2,45	1,50	27,5 %

Wie die Ergebnisse der Tabelle 4.6 zeigen, ist kein signifikanter Unterschied im poly(A)-RNA-Gehalt zwischen den einzelnen Medien zu beobachten, weder in der Aufnahme von ^3H -Adenosin, noch in der Ausbeute an poly(A)-RNA. Die Zellen zeigen in allen Medien eine erhöhte Aufnahme an Adenosin gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase, entsprechend auch einen erhöhten Gehalt an poly(A)-RNA. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß - obwohl die Polyadenylierungsreaktion in der Übergangsphase zum stationären Zustand verstärkt auftritt - keine Stimulation dieser Reaktion durch sporulationsfördernde Medien (wie das Hanson-Medium) eintritt.

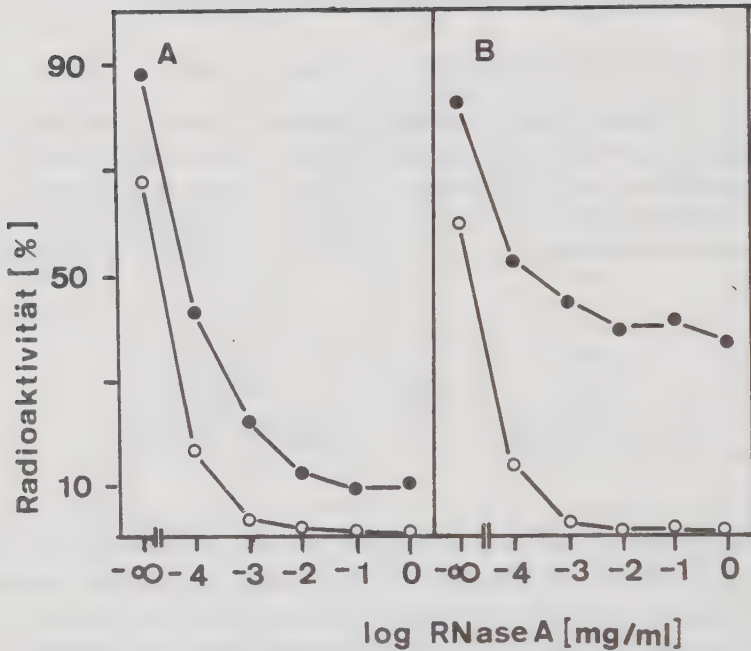


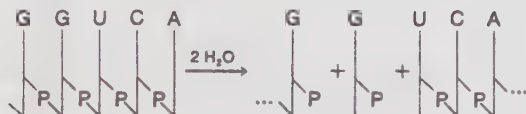
Bild 4.4: Verdauung von poly(A)-RNA mit unterschiedlichen Konzentrationen an pankreatischer RNase A. (siehe Methodenteil, 3.13) (A = poly(A)-RNA aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase; B = poly(A)-RNA aus der t_0 -Phase)

- ^3H -Adenosin-pulsmarkierte poly(A)-RNA
- ^3H -Uridin-pulsmarkierte poly(A)-RNA

tration (von 10^{-2} auf 1 mg/ml) resistent. Dadurch bestätigt sich, daß es sich bei den an oligo(dT)-Cellulose bindenden Proben tatsächlich um poly(A)-RNA handelt und nicht um eine unspezifische Bindung von nicht polyadenylierter RNA.

Um zu gewährleisten, daß die mit RNase A behandelten poly(A)-Ketten keine internen Guanidylreste enthalten, wird zusätzlich zur RNase A auch RNase T_1 bei den Verdauungsexperimenten zugegeben. RNase T_1 spaltet hinter jedem Guanidylrest einzelsträngiger

RNA und hinterläßt - analog zur RNase A - 3'-phosphorylierte RNA-Spaltstücke.



Die zusätzliche Behandlung der poly(A)-Segmente mit T_1 -RNase führt allerdings kaum zu einem Verlust von Radioaktivität der ^3H -Adenosin-markierten poly(A)-Proben (wie Tabelle 4.7 zeigt, wo die Ergebnisse der Verdauungsexperimente der einzelnen puls-markierten RNA-Proben zusammenfassend dargestellt werden). Der poly(A)-Gehalt der poly(A)-RNA nimmt gegen Ende des exponentiellen Wachstums zu (31,6 % der Radioaktivität sind gegen RNase A- und T_1 -Verdauung resistent) und steigt weiter während der stationären Phase (54,1 % bei t_3) an. Gleichzeitig kann man den Kontrollexperimenten (Inkubation der poly(A)-RNA ohne RNase-Verdauung und anschließende Auftrennung über oligo(dT)-Cellulose) entnehmen, daß die Stabilität der poly(A)-RNA von der exponentiellen zur stationären Phase abnimmt (88,3 % gegenüber 79,9 % Wiederfindungsrate). Da parallel zur Zunahme des poly(A)-Gehalts bei t_3 eine Abnahme des poly(A)-RNA Gehalts (siehe 4.3.2, Tab. 4.4) stattfindet, wird die Annahme bestätigt, daß die Akkumulation von poly(A) in der stationären Phase (siehe auch die poly(A)-RNA-Charakterisierungsexperimente unter 4.3.3) teilweise durch Abbau von poly(A)-RNA zustande kommt.

4.3.5.2 Bestimmung der Position der poly(A)-Segmente innerhalb der poly(A)-RNA-Sequenz

Die posttranskriptionelle Polyadenylierung am 3'-OH-Ende von mRNA ist in der Literatur für mehrere prokaryotische Systeme beschrieben worden; trotzdem wird die Position der poly(A)-Segmente

Tabelle 4.7

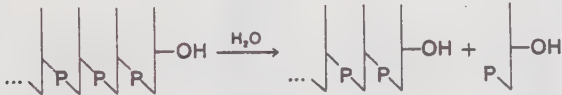
Anreicherung von pulsmarkierter gesamtzellulärer RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen und Bestimmung des poly(A)-Gehalts

Wachstumsphase	Radioaktiver Marker	Pulsmarkierte poly(A)-RNA (vor Behandlung mit RNasen) (cpm) $\times 10^6$	2. oligo(dT)-Durchlauf x) (% der cpm)	(cpm) $\times 10^5$	RNase A (%)	(cpm) $\times 10^5$	Poly(A)-Gehalt der poly(A)-RNA Anteil der Radioaktivität, der nach Verdauung an oligo(dT)-Cell. bindet (%)
mid-expon.	^3H -Adenosin	0,21	88,3 %	0,22	10,4	0,21	10,2
end-expon.	"	1,11	84,8 %	3,5	31,6	3,5	31,6
t_0	"	1,50	81,4 %	6,35	42,3	6,3	42,2
t_3	"	0,39	79,9 %	2,17	54,3	2,11	54,1
mid-expon.	^3H -Uridin	0,10	68,0 %	weniger	0,2		
t_0	"	0,10	59,6 %	als	0,2		

x) Hierbei handelt es sich um den Kontrollversuch, d.h. Inkubation der poly(A)-RNA ohne RNase-Behandlung und anschließende Aufreinigung über oligo(dT)-Cellulose (siehe 3.11).

bei poly(A)-RNA aus B. brevis (ATCC 9999), die in dieser Arbeit erstmals charakterisiert wurde, überprüft.

Zur Bestimmung der Position innerhalb der RNA-Sequenz werden die poly(A)-Segmente, nach Verdauung der poly(A)-RNA mit RNase A und T_1 und anschließender Reinigung über oligo(dT)-Cellulose, weiterhin einer Verdauung mit Schlangengift-Phosphodiesterase ausgesetzt. Dieses Enzym ist eine 3'-Exoribonuclease, die nur "freie" 3'-OH-Enden erkennt, phosphorylierte 3'-Enden - wie sie durch die Verdauung mit RNase A und T_1 entstehen - werden nicht degra-



diert, bevor das Phosphat am 3'-Ende mit Hilfe von alkalischer Phosphatase abgespalten (d.h. dephosphoryliert) wird. Aus dem Vergleich des Verdauungsmusters durch Schlangengift-Phosphodiesterase in Anwesenheit und Abwesenheit von alkalischer Phosphatase läßt sich der Anteil 3'-terminaler poly(A)-Segmente bestimmen.

Abb. 4.5 zeigt die Verdauungsmuster von poly(A)-Segmenten aus der mid-exponentiellen und der t_0 -Phase mit Schlangengift-Phosphodiesterase (jeweils 0, 1, 2,5 und 5 μg) in Anwesenheit (5 $\mu\text{g}/\text{Test}$) und Abwesenheit von alkalischer Phosphatase (siehe auch Methodenteil, 3.14). Zwischen 80 % und 90 % der poly(A)-Segmente aus beiden Wachstumsphasen werden durch die Schlangengift-Phosphodiesterase abgebaut, unabhängig von der An- oder Abwesenheit von alkalischer Phosphatase. Daraus kann man schließen, daß sich der überwiegende Anteil der poly(A)-Segmente am 3'-Ende der poly(A)-RNA-Ketten befindet.

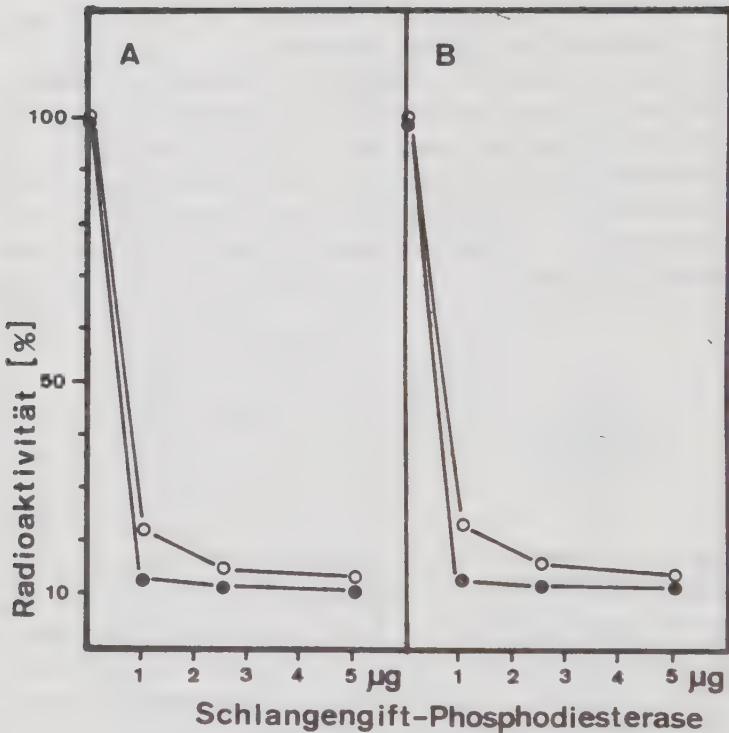


Bild 4.5: Verdauung der poly(A)-Segmente mit Schlangengift-Phosphodiesterase

- in Anwesenheit von alkalischer Phosphatase
- in Abwesenheit von alkalischer Phosphatase

(A = poly(A)-Segmente aus poly(A)-RNA aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase; B = poly(A)-Segmente von poly(A)-RNA aus der t_0 -Phase)
(Zur exp. Durchführung siehe 3.14.)

4.3.5.3 Bestimmung der poly(A)-Kettenlängen von poly(A)-RNA

Eine ungefähre Abschätzung der poly(A)-Kettenlänge kann man durch alkalische Hydrolyse der poly(A)-Segmente (und anschließende dünnschichtchromatographische Trennung der entstehenden Spaltprodukte) aus dem Verhältnis des gebildeten AMPs zu Adenosin

vornehmen, da bei der alkalischen Hydrolyse das 3'-terminale Nukleotid als Adenosin freigesetzt wird, alle anderen Adenylatreste aber als AMP abgespalten werden (allerdings müssen die Hydrolysebedingungen relativ mild sein, damit das gebildete AMP nicht dephosphoryliert wird). Tabelle 4.8 zeigt das Resultat von je drei Bestimmungen der verschiedenen poly(A)-Segmente (zur experimentellen Durchführung siehe Methodenteil, 3.15).

Tabelle 4.8

Abschätzung der poly(A)-Kettenlänge von poly(A)-RNA-Proben unterschiedlicher Wachstumsphasen aus dem Verhältnis AMP zu Adenosin

Wachstumsphase	hydrolysierte poly (A)-Menge (cpm)	Verteilung der Radioaktivität nach der Hydrolyse und dünnschicht-chromatographischen Trennung		
		AMP (cpm)	Adenosin (cpm)	AMP/Adenosin
mid-exponentiell	2.000	1.650 ± 200	30 ± 15	55 ± 40
spät-exponentiell	5.000	4.315 ± 375	90 ± 30	48 ± 25
t ₀	5.000	4.410 ± 260	75 ± 25	59 ± 25
t ₃	5.000	4.300 ± 300	100 ± 25	43 ± 15

Die Größenordnung der poly(A)-Segmente liegt zwischen 43 und 59 Nukleotiden, ohne daß man eine bestimmte Veränderung in Abhängigkeit der Wachstumsphase erkennt. Allerdings unterliegt diese Bestimmungsmethode, bedingt durch die Ungenauigkeit bei der Auswertung, sehr großen Schwankungen, da geringe Unterschiede in dem Adenosingehalt zu sehr stark abweichenden AMP/Adenosin-Verhältnissen führen.

Zur genaueren Bestimmung der poly(A)-Segmente wird eine elektrophoretische Trennung auf Polyacrylamid durchgeführt. Dazu werden poly(A)-Marker bekannter Größenverteilung (Durchschnittsgröße 146, 95, 74 und 23) aufgetragen und - aufgrund deren Mobilität im elektrischen Feld - die Größenverteilung der poly(A)-Proben aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen abgeschätzt (siehe auch Methodenteil, 3.16).

Abb. 4.6 zeigt die Verteilung der radioaktiven poly(A)-Proben (dargestellt als Histogramme) im Polyacrylamidgel. Die poly(A)-Segmente zeigen bis zu Beginn der stationären Wachstumsphase eine ziemlich einheitliche Größenverteilung mit einer Durchschnittsgröße von 42 Nukleotiden, in der stationären Phase (t_3) findet eine relative Verkleinerung der poly(A)-Segmente statt (Durchschnittsgröße 35 Nukleotide, 70 % der Radioaktivität befindet sich im Bereich zwischen 20 und 40 Nukleotiden). Auf Tabelle 4.9 werden die Eigenschaften der poly(A)-Segmente zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.9

Charakteristische Größenverteilung der poly(A)-Segmente aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen

Wachstumsphase	Größenverteilung der poly(a)-Segmente		
	(Gewichts-) Durchschnittsverteilung (50 % der cpm) (Nukleotide)	70 % der poly(A)-Seg- mente besitzen eine Größe zwischen (Nukleotide)	Größer als 50 Nukleo- tide sind (% der Ra- dioaktivität)
mid-exponentiell	42 ± 4	25 - 50	$29 \pm 3 \%$
spät-exponentiell	42 ± 4	25 - 50	$27 \pm 3 \%$
t_0	42 ± 4	25 - 50	$25 \pm 3 \%$
t_3	35 ± 3	20 - 40	$11 \pm 2 \%$

Aus der Bestimmung der poly(A)-Längen geht hervor, daß die in der späten exponentiellen Wachstumsphase verstärkt einsetzende Polyadenylierungsreaktion (siehe 4.3.2) keinen Einfluß auf die Länge der poly(A)-Segmente hat, sondern vielmehr der Anteil der polyadenylierten RNA-Population bei konstanter poly(A)-Größenverteilung zunimmt. Die Abnahme der poly(A)-Länge in der stationären Phase wird wahrscheinlich durch nukleolytischen Abbau hervorgerufen.

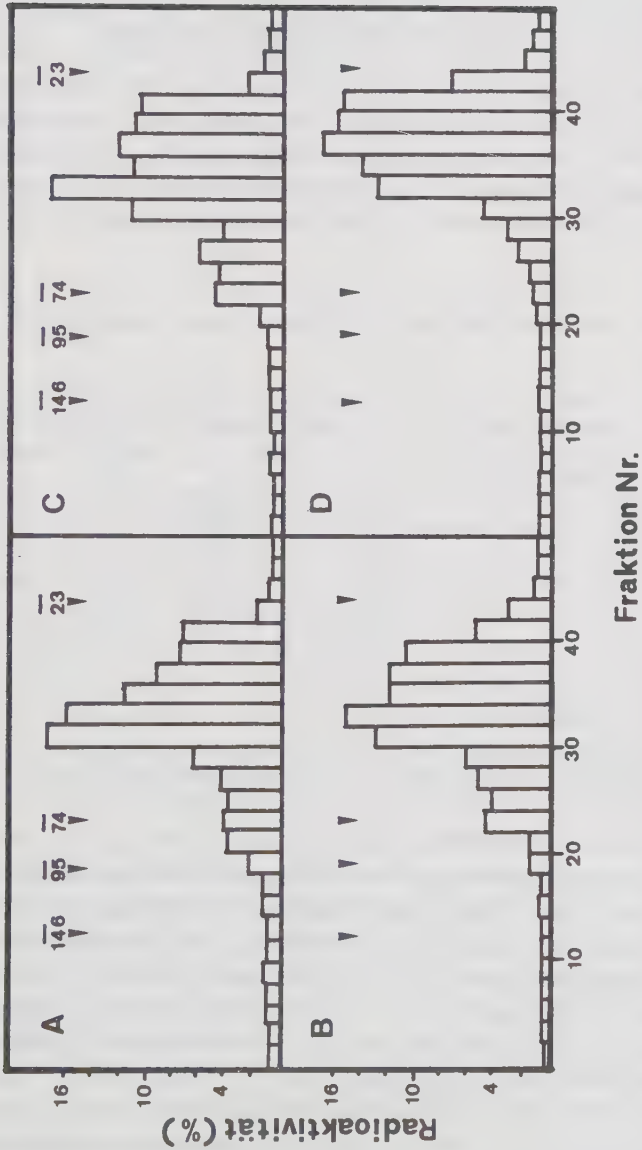


Bild 4.6: Verteilung der poly(A)-Segmente im Polyacrylamidgel nach stattdfundener Elektrophorese. (A = poly(A)-Segmente von poly(A)-RNA aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase; B = poly(A)-Segmente von poly(A)-RNA aus dem Ende der exponentiellen Wachstumsphase; C = poly(A)-Segmente von poly(A)-RNA aus t_0 ; D = poly(A)-Segmente von poly(A)-RNA aus t_3). (Ca. 20.000 cpm wurden pro Gelbahn aufgetragen.)

4.3.6 Poly(A)-Gehalt von gesamtzellulärer nicht pulsmarkierter RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

Zur in-vitro-Translation in einem zellfreien System wird gesamtzelluläre RNA aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen präpariert, die nicht mit radioaktiven RNA-Bausteinen pulsmarkiert wurde. Der poly(A)-Gehalt der RNA-Chargen wird durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U) bestimmt (siehe Methodenteil, 3.10).

Tabelle 4.10

RNA-Ausbeute von Zellen unterschiedlicher Wachstumsphasen und deren poly(A)-Gehalt

Wachstumsphase	RNA-Ausbeute pro g Zellen (Naßgewicht) (A_{260} -Units *)	poly(A)-Gehalt in gesamtzellulärer RNA		relativer poly(A)-Gehalt $\frac{\mu\text{g poly(A)}}{\mu\text{g RNA}} \times 100 \%$
		pro A_{260} -Unit (ng)	pro g Zellen (μg)	
mid-exponentiell	520 $\pm$ 50	8 $\pm$ 2	3,3 $\pm$ 0,8	0,020 $\pm$ 0,005 %
spät-exponentiell	450 $\pm$ 50	224 $\pm$ 25	100,8 $\pm$ 10,0	0,560 $\pm$ 0,050 %
t_0	380 $\pm$ 40	292 $\pm$ 30	111,0 $\pm$ 10,0	0,730 $\pm$ 0,070 %
t_3	245 $\pm$ 25	276 $\pm$ 30	67,6 $\pm$ 7,5	0,690 $\pm$ 0,070 %

*) 1 A_{260} -Unit entspricht 40 μg RNA

Die hier gezeigten Werte stellen einen Mittelwert für mindestens 3 RNA-Präparationen aus jeder Wachstumsphase dar.

Analog zur pulsmarkierten RNA (siehe 4.3.2) nimmt gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase der poly(A)-Gehalt der gesamtzellulären RNA stark zu (100,8 $\mu\text{g poly(A)/g}$ Zellen (Naßgewicht) im Vergleich zu nur 3,3 $\mu\text{g poly(A)/g}$ Zellen in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase); in der stationären Phase nimmt der poly(A)-Gehalt (67,6 $\mu\text{g poly(A)/g}$ Zellen) parallel zur Abnahme der RNA-Ausbeute, die nur noch ca. 50 % im Vergleich zu exponentiell wachsenden Zellen beträgt, ab.

Der poly(A)-haltige RNA-Anteil der einzelnen Proben wird durch oligo(dT)-Cellulose (je zwei Reinigungsdurchläufe) getrennt und deren poly(A)-Gehalt erneut durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U)

gemessen. In diesem Zusammenhang muß angemerkt werden, daß ein gewisser Anteil des poly(A)-Gehalts (zwischen 0,3 und 2,5 %) trotz zweimaliger Auftrennung durch oligo(dT)-Cellulose in der nicht poly(A)-haltigen RNA-Fraktion verbleibt (gemessen durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U)). Dieser poly(A)-Anteil stammt wahrscheinlich von sehr kurzkettigen poly(A)-Strängen, die nicht mehr an oligo(dT)-Cellulose binden, aber durch ^3H -poly(U)-Hybridisierung erfaßt werden können.

Tabelle 4.11 zeigt das Ergebnis der Auftrennung der poly(A)-haltigen RNA aus den gesamtzellulären RNA-Proben:

Tabelle 4.11

Anreicherung von poly(A)-haltiger RNA aus gesamtzellulären RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen

Wachstumsphase	Ausbeute an poly(A) RNA (nach zwei oligo(dT)-Durchläufen) (alle Werte bezogen auf 1 g präparierte Zellen) (μg)	poly(A)-Gehalt als % der Gesamt-RNA (μg)	relativer poly(A)-Ge- halt $\frac{\text{poly(A)}}{\text{poly(A)-RNA}} \times 100 \%$	
mid-exponentiell	72 ± 12	$0,35 \pm 0,06 \%$	$2,8 \pm 0,4$	$3,9 \pm 0,5 \%$
spät-exponentiell	340 ± 44	$1,89 \pm 0,25 \%$	$93,7 \pm 7,5$	$27,6 \pm 3,4 \%$
t_0	276 ± 35	$1,82 \pm 0,23 \%$	$97,2 \pm 7,5$	$35,2 \pm 4,0 \%$
t_3	116 ± 20	$1,18 \pm 0,20 \%$	$55,3 \pm 5,0$	$47,4 \pm 5,0 \%$
statistisches Mittel von drei Bestimmungen				

Der poly(A)-Gehalt der poly(A)-RNA steigt gegen Ende der exponentiellen Phase stark an (27,6 % der poly(A)-RNA), nimmt in der stationären Phase bis t_3 auf fast die Hälfte der poly(A)-RNA zu, obwohl die Ausbeute an poly(A)-RNA (116 μg) gegenüber der späten exponentiellen Phase (340 μg) und t_0 (276 μg) stark abfällt. Dieses Ergebnis deckt sich mit den Beobachtungen bei den Untersuchungen der pulsmarkierten RNA (siehe 4.3.5.1), wo ebenfalls eine Abnahme des poly(A)-RNA-Gehalts bei t_3 und eine gleichzeitige Zunahme des poly(A)-Gehalts festgestellt wurde. Es bestätigt die Vermutung, daß die poly(A)-RNA in der stationären Phase aus

einem Gemisch von intakter polyadenylierter mRNA und einem zunehmenden Anteil an teils oder ganz degradiertem poly(A)-RNA besteht, deren poly(A)-Teil allerdings gegenüber Degradation resistenter zu sein scheint.

4.4 Optimierung der Polyribosomen-Präparationsmethode

Eine der größten Schwierigkeiten bei der Isolierung von langkettigen Polyribosomen in Bakterien ist die Degradation der mRNA durch Ribonucleasen, die meistens nicht wirkungsvoll genug durch RNase-Inhibitoren (wie Heparin) geschützt werden kann. In Analogie zur gesamtzellulären RNA wird zuerst eine Methode entwickelt, die es ermöglicht, langkettige Polyribosomen aus B. brevis zu isolieren. Aufgrund einer in der Literatur beschriebenen Methode zur Isolierung von biologisch aktiven langkettigen Polyribosomen aus Eukaryoten durch Inhibition von RNasen (Adams et al., 1980) werden bei der Präparation von Polyribosomen aus B. brevis hohe Konzentrationen an EGTA (20 mM) eingesetzt. EGTA ist ein Chelator von zweiwertigen Metallionen wie Cu^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} , die oftmals als Kofaktoren von Ribonucleasen wirken.

Abb. 4.7 zeigt eine vergleichende Sedimentationsanalyse von Polyribosomen, isoliert in Gegenwart und in Abwesenheit von EGTA (mit Heparin als RNasen-Inhibitor). Die Präparation in Anwesenheit von EGTA liefert einen hohen Anteil an langkettigen Polyribosomen (im Durchschnitt 5 bis 10 Ribosomen), bei der Polyribosomenpräparation ohne EGTA wird ein hoher Anteil an Mono- und Diribosomen festgestellt.

Vergleicht man die Ausbeute (pro g Zellen Naßgewicht) und den poly(A)-Gehalt der Polyribosomen (präpariert aus Zellen der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase), so ergeben sich bemerkenswerte Unterschiede (Tabelle 4.12).

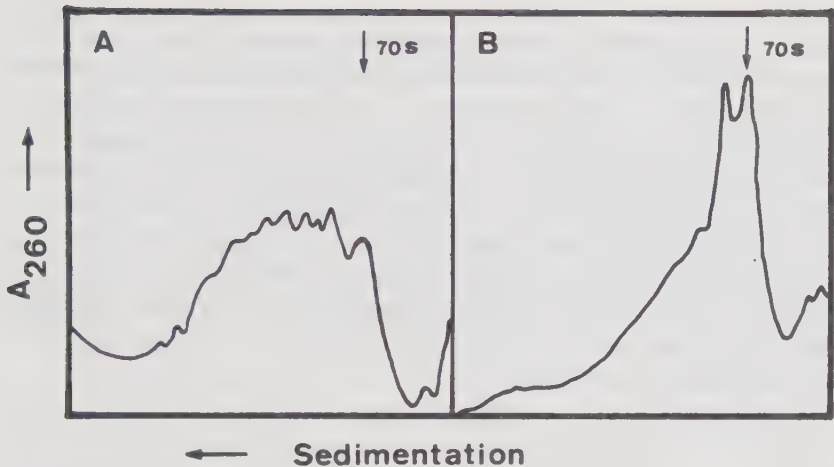


Bild 4.7: Sedimentationsanalyse von Polyribosomen (aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase) (A = in Gegenwart von 20 mM EGTA; B = ohne EGTA, jeweils 5 Units wurden ultrazentrifugiert) (siehe auch Methodenteil, 3.12.1).

Tabelle 4.12

Vergleich der Polyribosomenausbeute und des poly(A)-Gehalts unter verschiedenen Präparationsbedingungen

Präparationsmethode	Ausbeute an Polyribosomen (pro g Zellen) (in A_{260} -Units) a)	poly(A)-Gehalt pro Unit Polyribosomen (ng) b)	relativer poly(A)-Gehalt $\frac{\text{ng poly(A)}}{\text{ng Polyribosomen}} \times 100 \%$
mit EGTA	$84,7 \pm 5,5$	$3,05 \pm 0,5$	0,0086
ohne EGTA	$109,3 \pm 12,0$	$0,13 \pm 0,02$	0,0004

- a) Die Polyribosomenausbeute wird photometrisch bei 260 nm bestimmt, $1 A_{260} = 35 \mu\text{g RNA}$ (Clark und Switzer, 1972).
b) Die Bestimmung des poly(A)-Gehalts erfolgt durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U) (siehe Methodenteil, 3.10).

Die Polyribosomenausbeute in Abwesenheit von EGTA ist etwas höher als in Gegenwart von EGTA, der poly(A)-Gehalt aber wesentlich niedriger. Aus diesen Ergebnissen kann man schließen, daß

poly(A)-haltige RNA im Zusammenhang mit langkettigen Ribosomen vorkommt, während die kurzkettigeren Polyribosomen (Präparation ohne EGTA) kaum poly(A) enthalten. Trotz der niedrigeren Polyribosomenausbeuten werden alle nachfolgenden Untersuchungen in Anwesenheit von EGTA (mM) durchgeführt. Man muß bei der Präparation in Anwesenheit von EGTA darauf achten, daß die Konzentration an Mg^{2+} -Ionen doppelt so hoch wie die an EGTA ist, bei niedrigeren Mg^{2+} -Konzentrationen kommt es leicht zur Dissoziation und zum Zerfall der Polyribosomen (Mg^{2+} wird auch von EGTA komplexiert, was den Zerfall der Ribosomen in die Protein- und RNA-Bestandteile hervorruft).

4.5 Charakterisierung der polyribosomalen (poly(A)-RNA aus unterschiedlichen Wachstumsphasen

4.5.1 Präparation von Polyribosomen aus pulsmarkierten Zellen

Wie die Inkorporationsversuche (siehe 4.1) gezeigt haben, ist die Aufnahme von 3H -Adenosin in der späten exponentiellen Wachstumsphase und zu Beginn der stationären Phase am höchsten, obwohl sich gegenüber den Zellen aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase eine Abnahme der Polyribosomenausbeute (in A_{260} -Units) ergibt.

Tabelle 4.13

Ausbeute an radioaktiv pulsmarkierten Polyribosomen in Abhängigkeit der Wachstumsphase

Wachstumsphase	aufgenommene Radioaktivität in präparierter Zellmasse (1 g) (cpm) $\times 10^6$	Ausbeute an radioaktiv markierten Polyribosomen (cpm) $\times 10^6$	Ausbeute an Polyribosomen (pro g Zellen) (%) (A_{260} -Units)
mid-exponentiell	1,89	$0,33 \pm 0,04$	17,4 84,7 $\pm$ 5,5
end-exponentiell	22,30	$1,75 \pm 0,15$	7,8 73,3 $\pm$ 4,7
t_0	29,5	$2,12 \pm 0,20$	7,2 59,5 $\pm$ 4,0
t_3	3,1	$0,04 \pm 0,01$	1,3 26,6 $\pm$ 2,0

Die hier aufgeführten Werte stellen das statistische Mittel von drei Präparationen dar. Die Zellen wurden in Glutaminat-Medium angezogen (siehe Methodenteil, 3.3).

Die Ausbeute an radioaktiv pulsmarkierten Polyribosomen ist wesentlich niedriger im Vergleich zur radioaktiv pulsmarkierten Gesamt-RNA. Besonders deutlich fällt die geringe Inkorporation von ^3H -Adenosin bei t_3 auf; hier nimmt allerdings auch die Polyribosomenausbeute (26,6 A_{260} -Units/g Zellen) im Vergleich zur Mitte der exponentiellen Phase besonders stark ab (84,7 A_{260} -Units/g Zellen).

4.5.2 Anreicherung von polyribosomaler poly(A)-RNA durch Affinitätschromatographie

Zur Untersuchung des poly(A)-RNA-Gehalts der Polyribosomen aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen werden diese zuerst mit Proteinase K desintegriert (siehe Methodenteil, 3.10) und anschließend bei hohen Salzbedingungen über oligo(dT)-Cellulose bei Zimmertemperatur (jeweils zwei Reinigungsdurchläufe) aufgetrennt. Tabelle 4.14 zeigt das Ergebnis der Auftrennung des poly(A)-haltigen RNA-Anteils.

Tabelle 4.14

Anreicherung von polysomaler poly(A)-RNA durch Affinitätschromatographie mit oligo(dT)-Cellulose

Wachstumsphase	Radioaktivität, eluiert bei hoher Salzkonzentration (cpm) $\times 10^6$	Radioaktivität, eluiert bei niedriger Salzkonzentration (cpm) $\times 10^4$	% (der auf- getragenen cpm)
mid-exponentiell	0,31	0,8	2,4 %
end-exponentiell	1,27	14,2	8,1 %
t_0	1,94	13,4	6,3 %
t_3	0,038	0,1	3,1 %

Gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase ist eine Zunahme der polysomalen poly(A)-RNA (3- bis 4-mal mehr als in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase) festzustellen, innerhalb der stationären Phase geht der poly(A)-RNA-Gehalt wieder zurück (3,1 % der Radioaktivität bei t_3). Es zeigt sich also der gleiche Effekt wie bei den Untersuchungen an der gesamtzellulären RNA; allerdings fällt der prozentuale Anteil der polyadenylierten RNA der Polyribosomen in jeder Wachstumsphase wesentlich geringer aus (vgl. mit 4.3.2).

Aus diesen Ergebnissen kann man den Schluß ziehen, daß die pulsmarkierte RNA (hauptsächlich mRNA) vorwiegend erst nach stattgefundener Translation an den Ribosomen polyadenyliert wird.

4.5.3 Charakterisierung der polyribosomalen poly(A)-RNA durch Ultrazentrifugation

Die poly(A)-RNA-Proben der unterschiedlichen Wachstumsphasen werden zur weiteren Charakterisierung einer Ultrazentrifugation im Sucrosegradienten unterworfen (in Abb. 4.8 wird stellvertretend die aus der spät-exp. Phase dargestellt). Dabei zeigt sich in allen Phasen eine ähnliche polydisperse Größenverteilung zwischen 4 S und 30 S mit einem Maximum bei 7 S und einer Durchschnittsgröße von 9-10 S. Die Größenverteilung der polyribosoma-

len RNA entspricht derjenigen von gesamtzellulärer RNA (siehe 4.3.3), allerdings mit einigen Unterscheidungsmerkmalen:

1. Ein gewisser Anteil (ca. 10 %) der polyadenylierten RNA aus Polyribosomen sedimentiert im Bereich zwischen 20 S und 30 S. Bei gesamtzellulärer RNA ist in diesem Bereich keine poly(A)-RNA festzustellen. Dies könnte damit zusammenhängen, daß die polyadenylierte mRNA in Polyribosomen besser vor nukleolytischem Abbau geschützt wird.
2. Im Gegensatz zur poly(A)-RNA aus der gesamtzellulären Präparation zeigt die polyribosomale poly(A)-RNA in der stationären Phase (t_3) keine Abnahme der Größenverteilung zu kleineren Sedimentationskoeffizienten hin. Hierfür mag derselbe Grund wie bei 1. gelten.

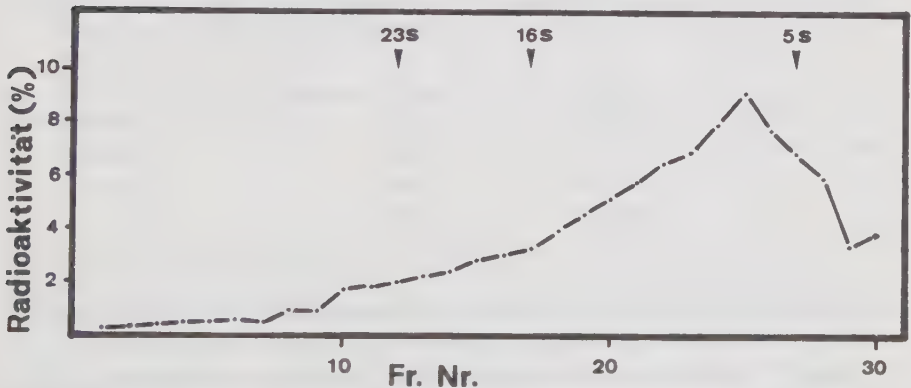


Bild 4.8: Radioaktivitätsverteilung im Sucrosegradienten von polyribosomaler poly(A)-RNA aus der späten exponentiellen Wachstumsphase (zur exp. Durchführung siehe Methodenteil, 3.12.2).

4.5.4 Bestimmung des poly(A)-Gehalts von polyribosomaler poly(A)-RNA nach Verdauung mit RNase A und T_1

Zur Bestimmung des poly(A)-Gehalts der einzelnen poly(A)-RNA-Proben wird (analog zur gesamtzellulären poly(A)-RNA, siehe 4.3.5.1) eine Verdauung mit RNase A und T_1 durchgeführt, anschließend werden die Proben über oligo(dT)-Cellulose getrennt und die Verteilung der Radioaktivität bestimmt. Tabelle 4.15 zeigt das Ergebnis eines derartigen Experiments:

Tabelle 4.15

Poly(A)-Gehalt polyribosomaler RNA unterschiedlicher Wachstumsphasen

Wachstumsphase	Verdaute poly(A)-RNA-Menge (cpm)	Poly(A)-Gehalt (Anteil der Radioaktivität, der nach Verdauung an oligo(dT)-Cellulose bindet) (cpm)	(% der auf- getragenen cpm)
mid-exponentiell	2.500	215	8,6 %
spät-exponentiell	10.000	1.860	18,6 %
t_0	10.000	1.980	19,8 %
t_3	1.000	114	11,4 %

Der poly(A)-Gehalt polyribosomaler poly(A)-RNA liegt niedriger als der von gesamtzellulärer poly(A)-RNA (z.B. beträgt er bei t_0 in polyribosomaler poly(A)-RNA 19,8 %, in gesamtzellulärer dagegen 42,2 %). Dieser Befund bestärkt die (unter 4.5.2 formulierte) Annahme, daß die Polyadenylierung von RNA hauptsächlich nach vollendeter Translation der mRNA (d.h. also nach Ablösung von den Ribosomen) stattfindet.

Aufgrund der geringen Radioaktivitätsmengen an polyribosomalem poly(A) (vor allem in der mid-exponentiellen und der t_3 -Phase) wird auf eine Längenbestimmung der poly(A)-Segmente verzichtet.

4.5.5 Poly(A)-Gehalt von polyribosomaler nicht pulsmarkierter RNA

Zur in-vitro-Translation von Polyribosomen in einem zellfreien System (siehe 4.6.2) werden nicht-pulsmarkierte Zellen aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen präpariert. Der poly(A)-Gehalt der Polyribosomen wird durch Hybridisierung mit ^3H -poly(U) nach Desintegration der Polyribosomen (siehe Methodenteil, 3.10) bestimmt.

Tabelle 4.16

Polyribosomenausbeute von Zellen unterschiedlicher Wachstumsphasen und deren poly(A)-Gehalt

Wachstumsphase	Polyribosomenausbeute pro g Zellen (Naßgewicht) (A_{260} -Units)	poly(A)-Gehalt in Polyribosomen pro A_{260} -Unit (ng)	poly(A)-Gehalt in Polyribosomen pro g Zellen (ng)	relativer poly(A)-Gehalt $\frac{\mu\text{g poly(A)}}{\mu\text{g RNA}} \times 100 \%$
mid-exponentiell	85 ± 5	$3,1 \pm 0,5$	$262,6 \pm 50$	0,009
spät-exponentiell	73 ± 5	$12,5 \pm 1,5$	$916,3 \pm 15$	0,036
t_0	60 ± 4	$10,3 \pm 1,5$	$612,9 \pm 13$	0,029
t_3	27 ± 2	$6,3 \pm 1,0$	$167,6 \pm 50$	0,018

1 A_{260} -Unit entspricht 35 μg RNA. Die hier dargestellten Werte stellen einen Mittelwert von 3 Polyribosomenpräparationen dar.

In Analogie zu den pulsmarkierten Polyribosomen (4.5.2) ist hier auch eine Zunahme des poly(A)-Gehalts gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase festzustellen. Im Vergleich beträgt der poly(A)-Gehalt der Polyribosomen aus der Übergangsphase zum stationären Zustand nur ca. 1 % des poly(A)-Gehalts der gesamtzellulären RNA.

4.6 In-vitro-Translationsuntersuchungen

4.6.1 In-vitro-Translation der gesamtzellulären RNA

Um nachzuweisen, daß es sich bei den poly(A)-RNA-Proben der unterschiedlichen Wachstumsphasen auch tatsächlich um mRNA handelt, ist eine in-vitro-Translation in einem zellfreien Extrakt erforderlich. Wie bereits im allgemeinen Teil beschrieben (2.2), sind derartige Versuche mit polyadenylierter RNA aus Prokaryoten bisher kaum durchgeführt worden. Untersuchungen der in-vitro-Translation von poly(A)-RNA aus B. subtilis (Graef-Dodds und Chambliss, 1978; Gopalakrishna und Sarkar, 1982a) haben nur geringe Aktivitäten erbracht, so daß eine fluorographische Darstellung der Translationsprodukte bisher nicht gezeigt werden konnte.

Problematisch bei der in-vitro-Translation von prokaryotischer RNA ist vor allem die kurze Halblebenszeit der mRNA, die nicht durch Modifizierung der RNA-Struktur am 5'-Ende ("cap"-Struktur) vor nukleolytischem Abbau geschützt wird. Zellfreie Extrakte enthalten meistens RNase-Aktivitäten, so daß prokaryotische mRNA, vor allem wenn sie in einer angereicherten Form vorliegt, nach Trennung der poly(A)-RNA über oligo(dT)-Cellulose schnell abgebaut wird.

4.6.1.1 Isolierung und Optimierung eines geeigneten zellfreien Extraktes

Zur zellfreien Translation wird ein "S-30"-Extrakt verwendet. Der S-30 (Überstand der Zentrifugation bei 30.000 x g) enthält die für die Translation von mRNA erforderlichen Komponenten: tRNAs, Aminoacyl-tRNA-Synthetasen, Translationsfaktoren (IFs, EFs, RFs) und Ribosomen.

Erste Versuche mit zellfreien Extrakten aus B. brevis (ATCC 9999) führten zu keinem erfolgreichen Ergebnis, da keine nennenswerte Stimulation der Proteinsynthese bei Zugabe von verschiedenen mRNA-Proben stattfand (Ergebnisse nicht gezeigt). Erst der Ein-

satz eines zellfreien Extrakts aus der RNase-armen E. coli-Mutanten D10 ergab ein System mit hoher Translationseffizienz. Kontrollexperimente haben gezeigt, daß eine DNase-Behandlung des E. coli-D10 zellfreien Extrakts eine Verringerung der Translationsrate (2- bis 3-mal weniger) hervorruft, dafür aber sinkt die endogene Aktivität (d.h. die Translationsaktivität ohne Zugabe von exogener mRNA) fast auf Null, während sie im nicht-DNase-behandelten Extrakt sehr hoch bleibt.

Tabelle 4.17

Vergleich der Translationseffizienz eines S-30-Extrakts aus E. coli-D10 unter verschiedenen Präparationsbedingungen

Präparation des S-30	Zugegebene S-30-Menge pro Test (in µg Protein)	Endogene Aktivität des S-30-Extrakts (picoMole eingebautes Valin)	Translationsaktivität bei Zugabe von MS 2 - mRNA*) (1 µg/Test)
ohne DNase	1,63	15,8	86,5
	2,25	63,1	194,0
	4,50	94,4	262,5
mit DNase	1,63	1,5	27,5
	2,25	1,7	89,7
	4,50	2,0	103,9

*) Dabei handelt es sich um mRNA des E. coli-Phagen MS 2. Die Inkubationszeit des Translationssystems beträgt 60 Minuten, die Temperatur 37°C (für nähere Details des Translationssystems siehe Methodenteil, 3.18).

Die starke Verminderung der endogenen Aktivität durch die DNase-Behandlung ist wahrscheinlich darauf zurückzuführen, daß im Zellextrakt noch vorhandene DNA die Transkription von RNA stimuliert, die dann unter den Testbedingungen translatiert wird (gekoppeltes Transkriptions-/Translationssystem).

Trotz der niedrigeren Translationseffizienz wird für die folgenden Translationsexperimente der 'DNase-behandelte' S-30-Extrakt verwendet, weil hierbei die endogene Aktivität vernachlässigbar klein ist.

4.6.1.2 In-vitro-Translation der einzelnen RNA-Proben unterschiedlicher Wachstumsphasen

Zur Optimierung der in-vitro-Translationsbedingungen werden folgende Translationsparameter überprüft:

1. Optimale Mg^{2+} -Konzentration
2. Temperatur und Inkubationszeit

Die Optimierungsversuche werden stellvertretend für die poly(A)-RNA aus der Mitte der exponentiellen Wachstums- und der t_0 -Phase dargestellt (Abb. 4.9).

Entsprechend den optimalen Translationsbedingungen ($37^{\circ}C$, 1 Stunde Inkubationszeit, 7-8 mM Mg^{2+} -Konzentration) wird die Abhängigkeit der Translationsaktivität von der poly(A)-RNA-Konzentration gemessen (Abb. 4.10).

Die poly(A)-RNA-Proben der unterschiedlichen Wachstumsphasen zeigen einen linearen Anstieg der Translationsaktivität bis auf 50 μg zugegebene RNA/ml Testvolumen; bei einer Konzentration von 200 $\mu g/ml$ ist in den meisten Fällen eine Sättigung erreicht; höhere RNA-Mengen führen zu keiner weiteren Stimulierung der in-vitro-Proteinsynthese. Die höchste spezifische Translationsaktivität (51,5 picoMole eingebautes/Valin/ μg eingesetzte poly(A)-RNA) wird in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase festgestellt, sie nimmt in der stationären Phase bei t_3 drastisch ab (3,4 pMol/ μg RNA), ebenso verhält es sich mit der maximalen Translationsaktivität bei sättigenden RNA-Konzentrationen (580 pMole in der mid-exponentiellen Phase, 52 pMole bei t_3). Die starke Abnahme der Translationseffizienz in der stationären Phase wird wahrscheinlich durch nukleolytischen Abbau der RNA bei gleichzeitig starker Abnahme der neu synthetisierten mRNA hervorgerufen.

Auf Tabelle 4.18 werden die Translationseigenschaften für die poly(A)-RNA, die nicht poly(A)-haltige RNA und die Gesamt-RNA zusammenfassend dargestellt. Die spezifische Translationsaktivität wird jeweils aus dem linearen Inkrement der Translationsaktivität im niedrigen RNA-Konzentrationsbereich ermittelt.

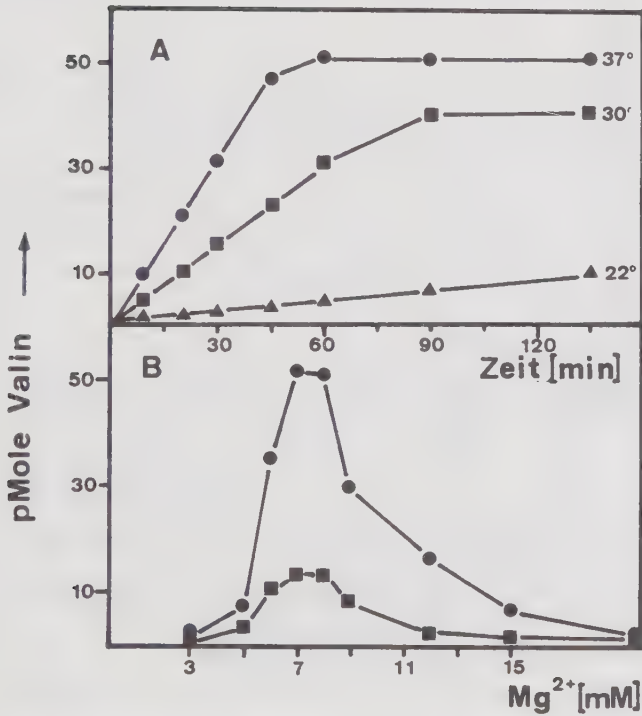


Bild 4.9: Abhängigkeit der Translationsaktivität im zellfreien System von verschiedenen Parametern
 A: Zeitkinetik der *in-vitro*-Translation von mid-exp. poly(A)-RNA (1 μ g) bei verschiedenen Temperaturen
 B: Abhängigkeit der *in-vitro*-Translation von der Mg^{2+} -Konzentration

- poly(A)-RNA aus der Mitte der exp. Phase
- poly(A)-RNA aus der t_0 -Phase

(je 1 μ g)

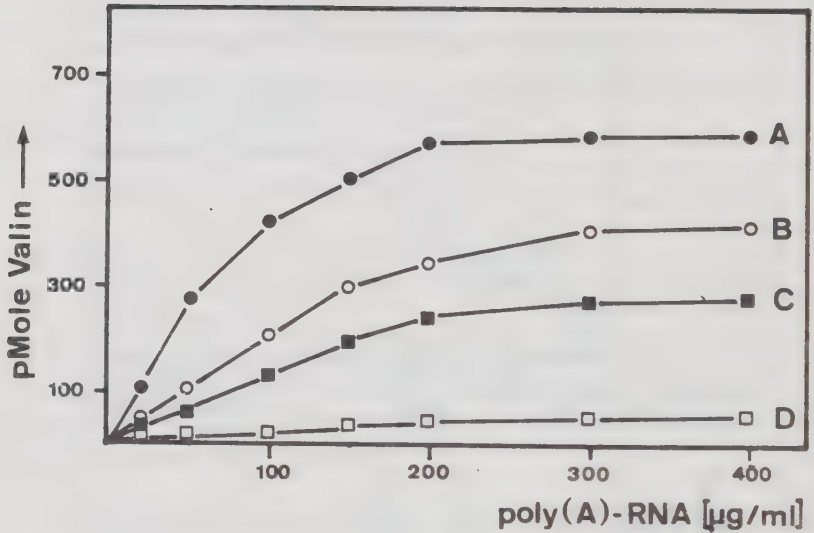


Bild 4.10: Abhängigkeit der Translationsaktivität von der poly (A)-RNA-Konzentration

- A: poly(A)-RNA aus der Mitte der exp. Phase
- B: poly(A)-RNA aus der spät-exp. Phase
- C: poly(A)-RNA aus der t_0 -Phase
- D: poly(A)-RNA aus der t_3 -Phase

Tabelle 4.18

In-vitro-Translationsaktivität der RNA-Fractionen aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen

RNA-Fraktion	spez. Translationsaktivität (pMole eingebautes Valin/ μ g RNA)	gesamte Translationsaktivität/g Zellen (n Mole eingebautes Val)	RNA-Fraktionierung (% der gesamten Translationsaktivität)
<u>Gesamt-RNA</u>			
mid-exponentiell	8,3	172,6	100 %
end-exponentiell	5,1	91,8	100 %
t_0	2,8	42,6	100 %
t_3	0,8	7,8	100 %
<u>Poly(A)[±]-RNA</u>			
mid-exponentiell	51,7	3,7	2,1 %
end-exponentiell	23,8	8,1	8,8 %
t_0	13,0	3,6	8,5 %
t_3	3,4	0,4	5,1 %
<u>Poly(A)⁻-RNA</u>			
mid-exponentiell	7,5	163,8	94,9 %
end-exponentiell	4,5	78,6	85,6 %
t_0	2,3	36,9	86,7 %
t_3	0,6	7,0	89,7 %

Die gesamte Translationsaktivität (pro g Zellen) der einzelnen RNA-Chargen wird berechnet, indem man die spez. Translationsaktivität mit der gesamten RNA-Menge der entsprechenden Fraktion (siehe dazu 4.3.6) (bezogen auf 1 g Zellen) multipliziert; z.B. ist die Gesamt-RNA-Ausbeute aus der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase 520 A_{260} -Units oder 20.800 μ g (1 A_{260} -Unit = 40 μ g RNA), die spez. Translationsaktivität ist 8,3 pMole/ μ g RNA; die gesamte Translationsaktivität pro g Zellen beträgt also: 20.800 x 8,3 = 172.640 pMole oder 172,64 nMole eingebautes Valin.

Wie Tabelle 4.18 zeigt, steigt der Anteil der gesamten Translationsaktivität der poly(A)-RNA von der Mitte der exponentiellen

Wachstumsphase (2,1 %) zum Ende der exponentiellen Wachstumsphase (8,8 %) und dem Beginn der stationären Phase (8,5 %) an, bei t_3 nimmt er wieder ab (5,1 %). Der überwiegende Anteil der gesamten Translationsaktivität verbleibt in der nicht-poly(A)-haltigen RNA-Fraktion. Die starke Zunahme der Polyadenylierung der RNA gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase, die zu einem hohen poly(A)-Gehalt der Zellen in der stationären Phase führt, hat offensichtlich keinen Einfluß auf die Translationseffizienz der mRNA, deren Aktivität in dieser Phase stark abnimmt.

Zur weiteren Charakterisierung der poly(A)-RNA-Fraktionen und zum Vergleich mit den nicht-poly(A)-haltigen RNA-Fraktionen aus den entsprechenden Wachstumsphasen werden die radioaktiv markierten Translationsprodukte auf einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt und durch fluorographische Aktivierung der radioaktiven Banden auf einem Autoradiogramm dargestellt. Abb. 4.11 zeigt im Vergleich die Translationsprodukte beider RNA-Fraktionen aus der mid-exponentiellen und der t_0 -Phase. Die Translationsprodukte der t_3 -Phase konnten nicht fluorographisch dargestellt werden, da die Translationseffizienz zu gering ist. Das Muster der in-vitro-Translationsprodukte zeigt, daß Proteine bis zu 70.000 Dalton synthetisiert werden. Vergleicht man die Translationsprodukte aus exponentiell wachsenden Zellen mit denen aus der t_0 -Phase, so kann man gewisse Unterschiede feststellen: Manche Proteinbanden treten stärker in der exponentiellen, manche stärker zu Beginn der stationären Wachstumsphase auf. Die poly(A)-RNA-Fraktionen zeigen im Vergleich zu den nicht poly(A)-haltigen aus derselben Phase kein unterschiedliches Translationsmuster. Aus der Ähnlichkeit der Muster kann man den Schluß ziehen, daß beide RNA-Populationen überwiegend (zu mehr als 90 %) für die gleichen Proteine codieren.

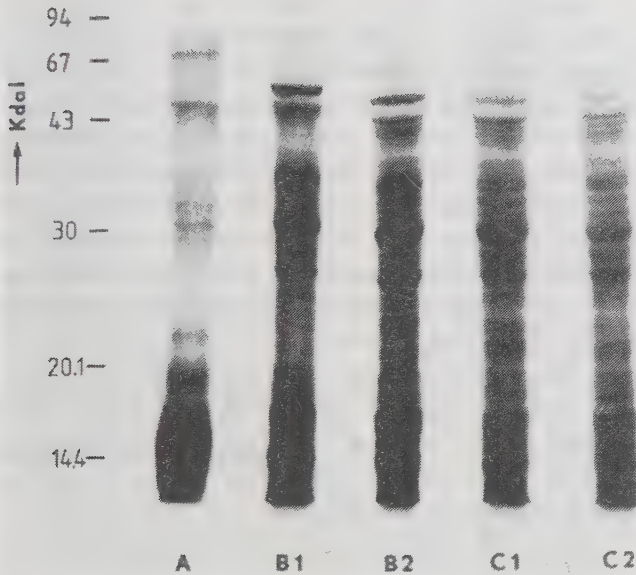


Bild 4.11: Autoradiogramm der in-vitro-Translationsprodukte von poly(A)⁺-RNA und poly(A)⁻-RNA

- A: MS-2 Phagenmessenger-Translationsprodukte als Vergleich
 B1: Poly(A)⁺-RNA-Translationsprodukte aus der mid-exp. Phase
 B2: Poly(A)⁻-RNA-Translationsprodukte aus der mid-exp. Phase
 C1: Poly(A)⁺-RNA-Translationsprodukte aus der t₀-Phase
 C2: Poly(A)⁻-RNA-Translationsprodukte aus der t₀-Phase

Molekulargewichtsmarker:

94	Kdal	Phosphorylase B
67	Kdal	Rinderserumalbumin
43	Kdal	Ovalbumin
30	Kdal	Karbonische Anhydrase
20,1	Kdal	Sojabohnen Trypsin-Inhibitor
14,4	Kdal	Lysozym

(pro Gelbande wurden ca. 10⁵ cpm radioaktiv markierter Translationsprodukte aufgetragen)

4.6.2 Untersuchungen der in-vitro-Translationsaktivität von Polyribosomen

Zur weiteren Charakterisierung werden Polyribosomen, isoliert aus den einzelnen Wachstumsphasen, auf ihre Translationseigenschaft untersucht. Dazu kann in diesem Fall ein S-150 (Überstand der Ultrazentrifugation bei $150.000 \times g$)-Extrakt aus B. brevis verwendet werden, da im Gegensatz zu der gesamtzellulären RNA die mRNA durch die Ribosomenstruktur besser vor nukleolytischem Abbau geschützt wird. Der S-150 zellfreie Extrakt enthält dieselben Komponenten wie der S-30 - mit Ausnahme der Ribosomen.

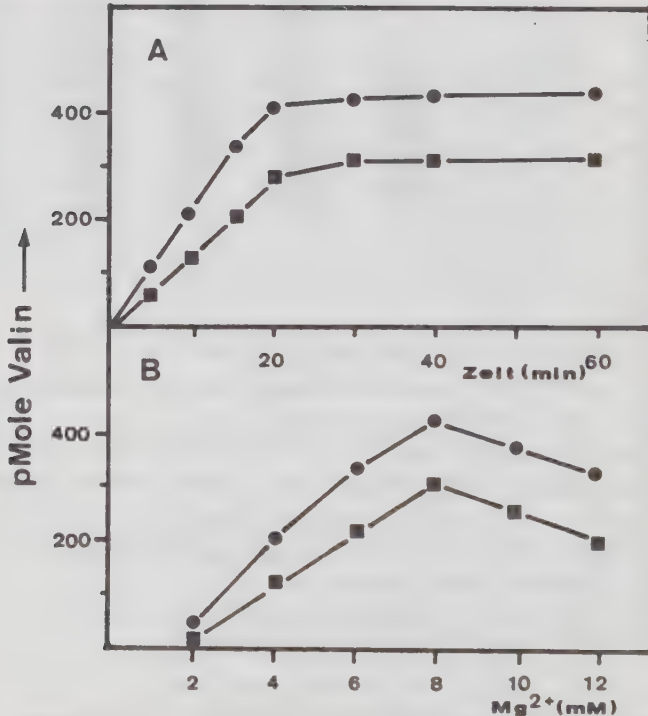


Bild 4.12: Parameter der Translationsaktivität von Polyribosomen im zellfreien System.

A: Abhängigkeit von der Inkubationszeit

B: Abhängigkeit von der Mg^{2+} -Konzentration

●—● Polyribosomen aus der Mitte der exp. Phase

■—■ Polyribosomen aus der t_0 -Phase

Die optimalen Bedingungen zur Translation von Polyribosomen (Zeit der Inkubation und Mg^{2+} -Konzentration) werden in Abb. gezeigt. Die optimale Mg^{2+} -Konzentration liegt analog wie im S-30 zellfreien System zwischen 7 und 8 mM (Abb. 4.12 B); hier zeigt sich bei höheren Mg^{2+} -Konzentrationen allerdings keine so starke Inhibition der Translation (siehe zum Vergleich 4.6.1.2). Nach 30 Minuten Inkubationszeit wird die maximale Translationsrate (Abb. 4.12 A) erreicht, die optimale Inkubationszeit liegt bei 37°C (Ergebnis nicht gezeigt). Das Ergebnis der konzentrationsabhängigen Translation der Polyribosomen aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen wird in Abb. 4.13 dargestellt. Es zeigt sich eine ähnliche Abhängigkeit wie in den gesamtzellulären Proben. Die anfängliche Translationsrate und die maximale Einbaurrate bei sättigender Polyribosomenkonzentration sind in der Mitte der exponentiellen Wachstumsphase am höchsten und nehmen in der stationären Phase bei t_3 stark ab. In Tabelle 4.19 werden die Eigenschaften der Polyribosomen (Polyribosomenausbeute/g Zellen, poly(A)-Gehalt und Translationseigenschaften) zusammenfassend dargestellt.

Tabelle 4.19

Vergleich der Polyribosomeneigenschaften in Abhängigkeit der Wachstumsphase

Wachstumsphase	Polyribosomenausbeute pro g Zellen (A_{260} -Unit)	Poly(A)-Gehalt pro A_{260} Polyribosomen (ng) ^{a)}	spez. Translationsaktivität pro A_{260} -Unit Polyribosomen ^{b)} (picoMole eingebautes Valin)	gesamte Translationsaktivität pro g Zellen
mid-exponentiell	84,7	3,1	91,0	7.708
spät-exponentiell	73,3	12,5	83,8	6.143
t_2	59,5	10,3	69,2	4.117
t_3	26,6	6,3	21,9	583

a) Der poly(A)-Gehalt wurde durch Hybridisierung der Polyribosomen mit 3H -poly(U) bestimmt (siehe 4.5.5).

b) Die spezifische Translationsaktivität wird aus dem linearen Inkrement im niedrigen Polyribosomenkonzentrationsbereich bestimmt.

Analog wie bei der gesamtzellulären RNA verursacht die Zunahme des poly(A)-Gehalts der Polyribosomen gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase keine Zunahme der Translationseffizienz polyribosomaler mRNA.

Daraus kann man abschließend schlußfolgern, daß beide Phänomene in keinem Zusammenhang zueinander stehen.

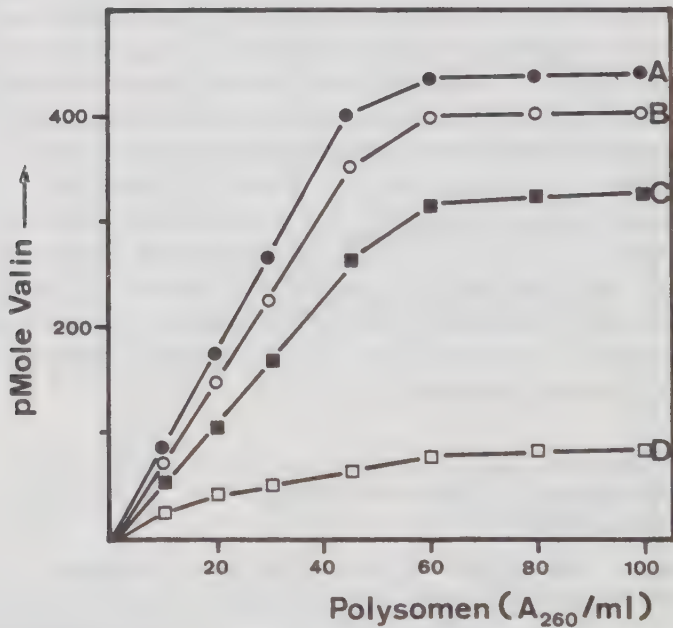


Bild 4.13: Abhängigkeit der Translationsaktivität von der Polyribosomenkonzentration

- A: Polyribosomen aus der Mitte der exp. Phase
- B: Polyribosomen aus der späten exp. Phase
- C: Polyribosomen aus der t_0 -Phase
- D: Polyribosomen aus der t_3 -Phase

5. DISKUSSION

5.1 Die Polyadenylierung von RNA in *B. brevis* (ATCC 9999)

In Tabelle 5.1 werden die in dieser Arbeit untersuchten Eigenschaften pulsmarkierter poly(A)-RNA in gesamtzellulärer und polyribosomaler RNA in Abhängigkeit der Wachstumsphase zusammenfassend dargestellt.

Sowohl bei der Gesamt-RNA wie bei den Polyribosomen ist gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase eine deutliche Zunahme des poly(A)-RNA-Gehalts festzustellen. In der stationären Phase (bei t_3) ist wiederum eine gewisse Abnahme des poly(A)-RNA-Gehalts zu beobachten.

Auffallend ist, daß der Anteil poly(A)-haltigen Materials in jeder Wachstumsphase bei der Gesamt-RNA höher ausfällt als bei der polyribosomalen RNA. Diese Beobachtung, die auch bei der Untersuchung des gramnegativen Organismus Caulobacter crescentus (Ohta et al., 1975; Ohta et al., 1978) gemacht wurde (siehe dazu auch die vergleichende Tabelle im folgenden Kapitel 5.2), deutet darauf hin, daß eine effektive Polyadenylierung der mRNA erst nach Vollendung der Translation und nach Ablösung der mRNA von den Ribosomen (sog. "run-off") stattfinden kann. Unklar ist dabei, ob die bereits abgelesene mRNA (wenigstens teilweise) in einem neuen Translationszyklus übersetzt wird. Nach dem geltenden Modell für die Translation von prokaryotischer mRNA erscheint dies unwahrscheinlich, da die Transkription und die Translation als zwei eng miteinander gekoppelte Vorgänge zu betrachten sind. Nach vollendetem Translationszyklus wird die prokaryotische mRNA durch RNasen abgebaut, ohne daß (im Gegensatz zur eukaryotischen mRNA) ein erneutes Ablesen stattfindet.

Tabelle 5.1
Eigenschaften pulsmarkierter poly(A)-RNA aus *B. brevis* (ATCC 9999)

RNA-Fraktion bzw. Präparationsmethode	Radioaktive RNA- Vorstufe	Wachstumsphase	Anteil des poly(A)- haltigen Materials an der pulsmarkier- ten RNA (% der Radioaktiv.)	Sedimen- tations- bereich	Durch- schnitts- verteil- ung bei	Anteil der Radio- aktivität, der nach Verdauung mit RNase A und I ₁ an oligo (dT)-Cellulose bin- det (%)	durchschnittliche poly(A)-Kettenlän- ge (bestimmt durch Polyacrylamidgel- elektrophorese (Adenosinreste)
Gesamt-RNA, LiCl/Harnstoff- Methode	³ H-Ado	mid-exp.	9,5	4-23 S	10 S	10,2	42
		end-exp.	23,3	4-23 S	9-10 S	31,6	42
		t ₀	30,1	4-16 S	7 S	42,2	42
		t ₃	20,2	4-16 S	5-6 S	54,1	35
	³ H-Urd	mid-exp.	7,8	4-23 S	10 S	0,2	--
		t ₀	14,7	4-16 S	9-10 S	0,2	--
		mid-exp.	2,4	4-30 S	7 S	8,6	n.b.
	Polyribosomen (ohne Phenol- extraktion)	end-exp.	8,1	4-30 S	7 S	18,6	n.b.
		t ₀	6,3	4-30 S	7 S	19,8	n.b.
		t ₃	3,1	4-30 S	7 S	11,4	n.b.

Wie Tabelle 5.1 zeigt, führt die Zunahme des poly(A)-haltigen Anteils der pulsmarkierten Gesamt-RNA gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase zu keiner Zunahme der durchschnittlichen poly(A)-Kettenlänge, bei t_3 ist eher eine gewisse Abnahme festzustellen (35 Adenosinreste gegenüber 42). Gleichzeitig findet man bei der poly(A)-haltigen Fraktion der Gesamt-RNA eine stetige Zunahme des RNase A/ T_1 -resistenten Anteils von der mid-exponentiellen Phase (10,2 %) bis zur stationären Phase (54,1 % bei t_3).

Dieser Effekt (Zunahme des RNase A/ T_1 -resistenten Anteils der polyadenylierten RNA bei konstanter bzw. leicht abnehmender poly(A)-Kettenlänge) könnte so erklärt werden, daß durch die schnelle Metabolisierung (Abbau durch RNasen) der polyadenylierten mRNA, deren poly(A)-Anteil aber resistenter gegenüber degradativem Abbau ist, eine starke Akkumulation von poly(A) in der stationären Phase zustandekommt.

Für dieses Phänomen sprechen auch andere Befunde: Die Zunahme des RNase A/ T_1 -resistenten Anteils in der stationären Phase konnte bei den Polyribosomen (11,4 % der radioaktiv pulsmarkierten poly(A)-RNA bei t_3 im Gegensatz zu 19,8 % bei t_0) nicht festgestellt werden. Man kann davon ausgehen, daß die Polyribosomenpräparationen in höherem Maße intakte mRNA enthalten als die Gesamt-RNA-Präparationen der entsprechenden Wachstumsphasen, da die mRNA durch die Ribosomenoberfläche besser vor degradativem Abbau geschützt wird.

Der prozentuale Anteil der pulsmarkierten poly(A)-haltigen RNA aus der t_0 -Phase ist bei Markierung mit ^3H -Adenosin doppelt so hoch wie bei der Markierung mit ^3H -Uridin (30,1 % gegenüber 14,7 % der Radioaktivität binden bei hoher Salzkonzentration an oligo(dT)-Cellulose), während sich der poly(A)-haltige RNA-Anteil aus exponentiell wachsenden Zellen nur gering unterscheidet (7,8 % bei ^3H -Uridin-Markierung gegenüber 9,5 % bei ^3H -Adenosin-Markierung). Allerdings muß auch berücksichtigt werden, daß der prozentuale Anteil an eingebautem Adenosin in poly(A)-RNA höher als an Uridin ist; bei erhöhter Polyadenylierung von pulsmarkierter RNA können sich daraus beträchtliche Unterschiede ergeben.

Die Sedimentationsanalyse der poly(A)-RNA-Fractionen zeigt eine Tendenz zur Abnahme der polyadenylierten RNA-Population in der stationären Phase (Abnahme der Durchschnittsverteilung der poly(A)-RNA von 10 S in der mid-exponentiellen Phase auf 5-6 S bei t_3).

Die starke Abnahme der spezifischen Translationsaktivität der poly(A)-RNA von der mid-exponentiellen Phase (51,7 pMole eingebautes Valin pro μg eingesetzte poly(A)-RNA) zur stationären Phase (3,4 pMole eingebautes Valin pro μg eingesetzte poly(A)-RNA bei t_3 ; siehe hierzu Tabelle 4.18).

Die Akkumulation von RNase A/ T_1 -resistentem Material in der stationären Phase könnte allerdings auch durch die (parallel zur Polyadenylierung von RNA stattfindende) Synthese von freier poly(A)-Säure durch das Enzym Polynucleotid-Phosphorylase stattfinden. Eine derartige Enzymaktivität, die zuerst für das Vorkommen von poly(A) in E. coli (Deutscher, 1978) postuliert wurde, konnte durch Untersuchungen mit Toluol-permeabilisierten E. coli-Zellen (Gopalakrishna und Sarkar, 1983) ausgeschlossen werden.

Die starke Zunahme des poly(A)-Gehalts gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase in B. brevis konnte auch in nicht puls-markierten RNA-Präparationen der unterschiedlichen Wachstumsphasen nachgewiesen werden, die in Tabelle 5.2 zusammenfassend dargestellt werden.

Tabelle 5.2

Poly(A)-Gehalt von nicht pulsmarkierter RNA der unterschiedlichen Wachstumsphasen

RNA-Fraktion	Wachstumsphase	RNA-Ausbeute/g Zellen (A ₂₆₀ -U)	poly(A)-Gehalt pro A ₂₆₀ -Unit (ng poly(A))	relativer poly(A)- Gehalt $\frac{\text{ng poly(A)}}{\text{ng RNA}} \times 100 \%$
Gesamt-RNA	mid-exp.	520	8,0	0,020
	end-exp.	450	224,0	0,560
	t ₀	380	292,0	0,730
	t ₃	245	276,0	0,690
Polyribosomen	mid-exp.	85	3,1	0,009
	end-exp.	73	12,5	0,036
	t ₀	60	10,3	0,029
	t ₃	27	6,3	0,018

Wiederum zeigt sich hier ein wesentlich höherer poly(A)-Gehalt in den Gesamt-RNA-Fraktionen im Vergleich zu den Polyribosomen, was auf eine weitere Polyadenylierung von RNA nach vollendeter Translation an den Ribosomen hindeutet und/oder die Akkumulation von (teils oder ganz) degradiertem poly(A)-RNA, deren poly(A)-Teil resistenter gegenüber RNasen-Wirkung ist.

5.2 Vergleich der Eigenschaften von prokaryotischer poly(A)-RNA

In Tabelle 5.3 erfolgt eine zusammenfassende Darstellung der bisher veröffentlichten Ergebnisse zur poly(A)-RNA in unterschiedlichen prokaryotischen Systemen (die wichtigsten Aspekte wurden bereits im Allgemeinen Teil, Kap. 2.2, diskutiert).

Die anfänglich sehr geringen Ausbeuten für den poly(A)-haltigen Anteil pulsmarkierter RNA aus E. coli (0,1 % - 0,5 %) (Perry et

al., 1972; Nakazato et al., 1975) konnten (wie bereits unter 4.2 beschrieben) dank einer effizienteren RNA-Präparationsmethode ohne Phenolextraktionsschritte (Sarkar et al., 1978) weitaus verbessert werden (bis zu 24 % der Radioaktivität in pulsmarkierter E. coli-RNA binden an oligo(dT)-Cellulose; Gopalakrishna et al., 1981). Wie unter 4.2 beschrieben, ist diese Methode, bei der eine Verdauung des Gesamtproteins im Zellextrakt durchgeführt wird, nicht für funktionelle Untersuchungen der isolierten RNA wie die in-vitro-Translation im zellfreien System geeignet, da geringste Spuren der Protease reichen, um den Test empfindlich zu stören. Deshalb wurde im Rahmen dieser Arbeit eine alternative Methode entwickelt, die auf einer LiCl-Fällung der Gesamt-RNA in Gegenwart von Harnstoff beruht.

Vergleicht man den poly(A)-haltigen Anteil pulsmarkierter RNA der verschiedenen Prokaryoten, so fällt auf, daß er bei den bisher untersuchten Stämmen von B. brevis am höchsten liegt (mit 30 % - 50 % der Radioaktivität in pulsmarkierter RNA, die an Affinitätsmatrizen für poly(A) bindet). Bei den Untersuchungen des Stammes 47 (Hussain et al., 1982) und ATCC 9999 (diese Arbeit) wird eine verstärkte Polyadenylierung von RNA gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase festgestellt. Bei den Untersuchungen des Stammes ATCC 8185 liegen bisher widersprüchliche Ergebnisse vor: Während Gopalakrishna und Mitarbeiter keinen Unterschied im poly(A)-Gehalt in der exponentiellen Wachstumsphase im Vergleich zum stationären Zustand (t_2) feststellen können (Gopalakrishna et al., 1981), deuten andere Ergebnisse (Komura, 1982) auch auf ein verstärktes Auftreten polyadenylierter RNA am Ende der exponentiellen Wachstumsphase des Stammes ATCC 8185 hin.

Der hohe poly(A)-RNA-Anteil von Bacillus brevis läßt diesen Organismus als besonders geeignet für weitere Untersuchungen prokaryotischer poly(A)-RNA erscheinen.

Eine relativ gute Übereinstimmung findet man in den bisherigen Ergebnissen bei der Bestimmung der Größenverteilung pulsmarkierter poly(A)-RNA durch Ultrazentrifugation. Die meisten Arbeiten berichten über eine polydisperse Verteilung zwischen 4 und 20 S mit einer Durchschnittsgröße der poly(A)-RNA zwischen 7 und 10 S,

Tabelle 5.3

Zusammenfassung der Eigenschaften von poly(A)-RNA in Prokaryoten

Organismus	RNA-Fraktion bzw. Präparationsmethode	Radioaktive RNA-Vorstufe zur Pulsmarkierung	Wachstumsphase	Anteil des poly(A)-haltigen Materials an der pulsmarkierten RNA (Σ der Radioaktivität, die an oligo(dI)-Cellulose binden)	Sedimentationsverhalten der poly(A)-RNA	Anteil der Radioaktivität, der nach Verdauung mit RNase A und 7 an oligo(dI)-Cellulose bindet (Σ)	Bemerkungen	Literaturhinweis
a) Gramnegative Bakterien								
<i>E. coli</i> , D-10 (RNase-arm)	Polyribosomen (phenolextr.)	³ H-Urd	exp.	0,1-0,5	n.d.	0,0	poly(A)-RNA durch Bindung an Millipore-Filter bestimmt	Perry et al., 1972
<i>E. coli</i> , D-10	Gesamt-RNA (phenolextr. bei 60°C)	³ H-Ado	exp.	0,2	polydispers, 4-20S, Max. bei 10S	17,7		Nakazato et al., 1975
<i>E. coli</i> , PR-7 ^{b)}	Gesamt-RNA (phenolextr.)	³ H-Ado/ ³ H-Urd	exp.	14,0 14,0	n.d.	30-50	ein hoher poly(A)-Gehalt wurde nur bei Phosphatinitrierung des Mediums gefunden	Srinivasan et al., 1975
<i>E. coli</i> , B	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung (phenolextr.)	³ H-Ado ³ H-Urd ³ H-Ado	exp.	24,0 18,0 0,3	n.d.	8,0		Gopalakrishna et al., 1981
Toluol-permeabilisierte Zellen								
<i>E. coli</i> , B	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung	³ H-ATP ³ H-UTP		12,0 15,0	polydispers, 4-10S, Max. bei 6S	14,0 0,5	durch die Toluol-Behandlung wachsen die Zellen nicht mehr, werden aber durchlässig für energiereiche RNA-Vorstufen wie ATP oder UTP	Gopalakrishna and Sarker, 1983
PR-7/ PR-100		³ H-ATP ³ H-UTP		8 7		17,7 0,5		
<i>Caulobacter crescentus</i>	Gesamt-RNA (phenolextr. bei pH 9) Polyribosomen (phenolextrahiert)	³ H-Ado ³ H-Ado	exp.	7,6 0,5-2,3	polydispers, Max. bei 7S	ca. 50,0 n.d.		Ohta et al., 1975 Ohta et al., 1978
<i>Hyphocicrobium</i>	Gesamt-RNA (phenolextrahiert)	³ H-Adenin	exp.	0,039	polydispers, 4-30S	14,2	der Organismus hat eine sehr hohe Generationszeit (8h)	Schultz et al., 1978
<i>Anabaena variabilis</i>	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung	³ H-Ado	ohne Dunkelreaktion nach 3 Stunden Dunkelreaktion	5,4 22,8	n.d.	7,1 12,1	das photosynthetisierende Cyanobakterium enthält nach 3 Stunden Dunkelreaktion einen höheren poly(A)-Gehalt	Crouch et al., 1983
b) Grampositive Bakterien								
<i>Bacillus subtilis</i> 168 T ^a	Gesamt-RNA (phenolextrahiert)	³ H-Ado	exp. t ₀ t ₂	5-10 4-6 3	n.d.	n.d.		Graef-Dodds and Chamberliss, 1978
<i>B. subtilis</i> 168 H	Gesamt-RNA (phenolextrahiert)	³ H-Ado	exp. t ₀ t ₂	0,8 12,0 20,5	n.d. polydispers, 3-14S, Max. bei 6S	3,5 35,0 38,4	sporulationsnegative Mutanten zeigen in keiner Phase poly(A)	Kerjan and Szuinajster, 1980
<i>B. subtilis</i> , ATCC 6051	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung	³ H-Ado	exp. t ₂	16,0 12,0	n.d.	n.d.	sporulationsnegative Mutanten zeigen ähnlichen poly(A)-Gehalt wie der Wildtyp	Gopalakrishna et al., 1981
<i>B. subtilis</i> , ATCC 23856	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung	³ H-Ado	exp.	10,3	n.d.	13,5		Gopalakrishna and Sarker, 1982a
<i>B. subtilis</i> , SB 19	Gesamt-RNA (phenolextrahiert)	³ H-Urd	keisende Zellen	ca. 5,0	n.d.	n.d.		Hecker et al., 1981
<i>B. polymixa</i>	Gesamt-RNA (phenolextrahiert)	³ H-Ado	exp. WT spo0 WT spo0 spoII spoIV	exp. 4,0 0,0 1,4 1,5 2,3 1,8	t ₂ 12,0 0,0 10,2 1,1 0,7 7,0	5-9S (t ₂)	nur sporulationsnegative Mutanten, die in "früherem" Genbereich (spo0-Mutanten) defekt sind, zeigen bei t ₂ einen veränderten poly(A)-Gehalt	Kaur and Jayarasan, 1979 Jayaraman and Murthy, 1982
<i>B. brevis</i> , ATCC #185	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung	³ H-Ado ³ H-Ado ³ H-Urd	exp. exp. exp.	30,0 37,0 26,0	polydisp., Max. bei 7S n.d.	30,0 n.d.	kein Einfluß der Wachstumsphase auf poly(A)-Gehalt	Sarker et al., 1978 Gopalakrishna et al., 1981
<i>B. brevis</i> , Stamm 47	Gesamt-RNA, Proteinase K-Behandlung	³ H-Ado ³ H-Urd	Ende der exp. Phase	50,0 20,0	polydisp., Max. bei 23S	40,0	der hohe poly(A)-Gehalt korreliert mit der hohen Produktionsrate der sekretorischen Proteine	Hussain et al., 1982
^{a) Mutanten, die nur wenig extrazell. Protein produziert}								
		³ H-Ado	"	20,0				

was einer Länge von 300 bis 600 Nukleotiden entspricht. Ungewöhnlich groß ist die Verteilung der poly(A)-RNA von B. brevis Stamm 47 mit einer Durchschnittsgröße von 23 S.

In diesem Zusammenhang sollten nochmals die besonderen Schwierigkeiten bei der Isolierung intakter prokaryotischer mRNA erwähnt werden: eine Diskrepanz zwischen der in-vivo vorkommenden poly(A)-RNA-Größenverteilung und der in-vitro gemessenen ist aufgrund der Labilität prokaryotischer mRNA durchaus möglich. Tabelle 5.4 zeigt eine zusammenfassende Darstellung der bisher ermittelten poly(A)-Kettenlängen prokaryotischer RNA. Auch hier findet man eine relativ gute Übereinstimmung für die unterschiedlichen prokaryotischen Systeme mit einer poly(A)-Durchschnittslänge von 15-60 Adenosinresten. Ungewöhnlich groß ist die für poly(A)-RNA aus stationären B. subtilis-Zellen ermittelte poly(A)-Kettenlänge von 160 Nukleotiden. Mit einer einheitlichen Größenverteilung von 95 Adenosinresten ist die poly(A)-Kettenlänge der RNA aus B. brevis, Stamm 47, auch überdurchschnittlich groß im Vergleich zu anderer prokaryotischer poly(A)-RNA, während die in dieser Arbeit ermittelten poly(A)-Kettenlänge für den Stamm ATCC 9999 mit 42 Adenosinresten den kleinsten Wert der bisher untersuchten B. brevis-Stämme darstellt.

Tabelle 5.4

Poly(A)-Kettenlänge prokaryotischer RNA

Organismus	Wachstumsphase	Durchschnittsverteilung (Anzahl der Nukleotide)	70 % der Ketten haben eine Länge zwischen (Nukleotide)	Bemerkungen	Literaturhinweis
E.coli, D-10	exp.	45 (häufigste Länge)			Nakazato et al., 1975
E.coli, Stamm B (Toluvol-behandelt)		48 (Gewichts-) 39 (Größen-)			Gopalakrishna and Sarkar, 1983
Caulobacter crescentus	exp.	15-25 (Gesamt-RNA) 13-17 (Polyribosomen)		bestimmt aus dem Verhältnis AMP/Ado	Ohta et al., 1975 Ohta et al., 1978
Hyphomicrobium	exp.		15-40		Schultz et al., 1978
Anabaena variabil.		21-26		"	Crouch et al., 1983
B.subtilis, 168 M	t ₃	160	160-180		Kerjan and Szulmajster, 1980
B.subtilis, ATCC 6051		49 (Gewichts-)	35-80		Gopalakrishna and Sarkar, 1982
B.poly-mixa	stat. Phase	5-30		"	Jayaraman and Murthy, 1982
B.brevis, ATCC 8185	mid-exp.	60 (Gewichts-) 48 (Größen-)	50 ± 14		Sarkar et al., 1978
B.brevis, Stamm 47	end-exp.	95	einheitl. Größenverteilung		Hussain et al., 1982
B.brevis, ATCC 9999	mid-exp.	42	25-50		Altman, Diss.
	end-exp.	42 (Gewichts-)	25-50		
	t ₀	42	25-50		
	t ₃	35	20-40		

5.3 In-vitro-Translation von mRNA aus *B. brevis* (ATCC 9999)

Wie die in-vitro-Translationsexperimente mit Gesamt-RNA und Polyribosomen gezeigt haben, scheint kein direkter Zusammenhang zwischen der spezifischen Translationsaktivität und der Zunahme des poly(A)-Gehalts gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase zu bestehen, da jeweils eine stetige Abnahme der Translationsaktivität von der mid-exponentiellen zur stationären Phase festgestellt wird.

Die Abnahme der spezifischen Translationsaktivität zeigt sich besonders deutlich bei der Translation der poly(A)-RNA-Fractionen, die von der Gesamt-RNA verschiedener Wachstumsphasen isoliert wurden. So geht die spezifische Translationsaktivität in der stationären Phase (t_3) auf 1/15 im Vergleich zur mid-exp. Translationsaktivität zurück.

Aufgrund der in-vitro gemessenen Translationskapazität der mRNA-Fractionen (poly(A)⁺- bzw. poly(A)⁻-RNA) wird in dieser Arbeit eine Abschätzung des polyadenylierten mRNA-Anteils in den unterschiedlichen Wachstumsphasen vorgenommen (siehe dazu auch 4.6.2.2, Tabelle 4.18).

Tabelle 5.5

Anteil der poly(A)-mRNA an der Gesamt-mRNA von *B. brevis* (ATCC 9999)

Wachstumsphase	Anteil der poly(A)-mRNA an der gesamten Trans- lationskapazität (%)
mid-exp.	3,7
end-exp.	8,1
t_0	3,6
t_3	0,4

Daraus geht hervor, daß der poly(A)-mRNA selbst gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase weniger als 10 % der gesamten Translationskapazität beträgt. Obwohl diese Werte im Vergleich

zu den in der Zelle wirklich vorliegenden poly(A)-mRNA-Konzentrationen wahrscheinlich zu niedrig ausfallen (bedingt durch Degradationserscheinungen während der Isolierung der poly(A)-RNA-Fractionen über oligo(dT)-Cellulose), kann man sie als approximativen Richtwert für den Anteil polyadenylierter mRNA in der Zelle verwenden.

Die wenigen bisherigen Angaben über den polyadenylierten mRNA-Anteil in prokaryotischen Systemen erfolgten aufgrund des relativen poly(A)-Gehalts (bezogen auf den Gesamt-RNA-Gehalt der Zelle); so wurde für E. coli ein Anteil von 50 % an der Gesamt-RNA abgeschätzt (Gopalakrishna et al., 1981), für B. subtilis von ca. 25 % (Gopalakrishna und Sarkar, 1982a). Diese Abschätzungen scheinen genau so wenig zuverlässig den tatsächlichen poly(A)-mRNA-Gehalt in der Zelle wiederzugeben wie Abschätzungen aus dem prozentualen Anteil der in-vivo inkorporierten Radioaktivität in pulsmarkierter RNA, die an Affinitätssäulen für poly(A) bindet (dieses Problem wurde bereits in der Einleitung des Ergebnisteils diskutiert).

Aufgrund der fluorographischen Darstellung der in-vitro translatierten mRNA-Fractionen kann man davon ausgehen, daß der überwiegende Anteil der verschiedenen mRNAs in B. brevis sowohl in polyadenylierter wie auch in nicht polyadenylierter Form vorliegt, wobei die zweite Form deutlich überwiegt.

Da in dieser Arbeit erstmals die Darstellung der in-vitro-Translationsprodukte prokaryotischer poly(A)-mRNA gelungen ist, kann kein direkter Vergleich zu anderen prokaryotischen Systemen gezogen werden. Trotzdem gibt es eindeutige Hinweise dafür, daß bei anderen Prokaryoten ähnliche Verhältnisse vorliegen. So ergab die Hybridisierung von polyadenylierter und nicht polyadenylierter RNA mit DNA-Restriktionsfragmenten sowohl für B. subtilis (Gopalakrishna und Sarkar, 1982a), wie auch für E. coli (Gopalakrishna und Sarkar, 1983) sehr ähnliche Hybridisierungsmuster.

Aufgrund der Darstellung der in-vitro-Translationsprodukte der poly(A)-mRNA aus der exponentiellen und der stationären Phase von B. brevis kann man auch erkennen, daß die gegen Ende der

exponentiellen Wachstumsphase verstärkt einsetzende Polyadenylierungsreaktion ein Phänomen ist, das die gesamte mRNA-Population betrifft und nicht nur spezifische mRNAs, die im Zusammenhang mit dem Differenzierungsprozeß in der Zelle auftreten. Dieser Befund spricht gegen die für B. subtilis (Kerjan und Szulmajster, 1980; Kerjan et al., 1982) und für B. polymixa (Kaur und Jayaraman, 1979; Jayaraman und Murthy, 1982) formulierte Hypothese, daß die Polyadenylierung von RNA in grampositiven Organismen nur spezifische mRNA-Transkripte von Sporulationsgenen betrifft.

5.4 Zur möglichen Funktion der Polyadenylierung von RNA

Wenig ist bisher über die mögliche Funktion von poly(A)-RNA in prokaryotischen Zellen bekannt. Die einzige bisherige Untersuchung (Gopalakrishna und Sarkar, 1981) zeigt, daß eine 3'-5'-Exoribonuclease (aus B. brevis, Stamm ATCC 8185) poly(A)-RNA aus B. subtilis und B. brevis (ATCC 8185) zehnmal langsamer vom 3'-Ende degradiert als nicht poly(A)-haltige RNA derselben Organismen. Dieses Ergebnis deutet darauf hin, daß poly(A) - analog wie bei eukaryotischer RNA - einen Einfluß auf die Stabilität der mRNA haben könnte. Allerdings erscheint eine derartige Funktion bei prokaryotischer RNA zweifelhaft, da keine gleichzeitige Modifizierung zum Schutz des 5'-Endes (wie bei Eukaryoten durch die "cap"-Struktur) stattfindet. Es stellt sich also die Frage, inwiefern der Schutz des 3'-Endes der mRNA sinnvoll ist, wenn sie gleichzeitig vom 5'-Ende abgebaut wird.

Bezeichnend ist die Tatsache, daß die Polyadenylierung von RNA in B. brevis (ATCC 9999) in der spät-exponentiellen Phase stattfindet - zu einem Zeitpunkt also, wo - bedingt durch die Verarmung der Nährstoffquellen im Wachstumsmedium - ein Zelldifferenzierungsprozeß eingeleitet wird.

So produziert der Stamm in dieser Phase auch große Mengen an Gramacidin S, ein zyklisches Dekapeptid, das (nicht-ribosomal)

von einem in dieser Phase induzierten Enzymkomplex (Gramicidin S-Synthase) unter ATP-Verbrauch synthetisiert und von den Zellen teilweise ins Medium ausgeschieden wird - als Antwort auf eine sich verändernde Umgebung.

Die Zellen organisieren in der spät-exponentiellen Wachstumsphase ihren Metabolismus so, daß unnötige Energiespeicher (so z.B. in Form von ATP) verbraucht werden (sog. "spilling of excess energy", siehe dazu Neijssel und Tempest, 1976). Veränderungen des ATP-Spiegels in der Zelle sind auch im Differenzierungsprozeß von Hefen wie *Dyctyostelium discoideum* festgestellt worden (Wooley und Jones, 1970).

So könnte auch die Polyadenylierung von RNA in *B. brevis* Teil einer Reihe von ATP-verbrauchenden Reaktionen sein, als Anpassung an limitierte Wachstumsbedingungen.

Eine starke Abnahme des ATP-Spiegels in der Zelle gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase wurde auch in *B. subtilis* (Stamm 168) festgestellt (Hutchinson und Hanson, 1974). Gleichzeitig wurden auch die während des exponentiellen Wachstums blockierten Gene für die Expression der Enzyme des Tricarbonsäurezyklus dereprimiert. Deshalb wird angenommen, daß die temporäre drastische Abnahme des ATP-Spiegels als Regulationszeichen für die Auslösung ("commitment") der Sporulation dient (Hutchinson und Hanson, 1974).

Eine weitere mögliche Funktion für poly(A) in *B. brevis* ergibt sich aus den Untersuchungen von Hussain und Mitarbeitern (1982; siehe Allgemeinen Teil, 2.2) mit dem Stamm 47. Hier findet auch in der spät-exponentiellen Phase eine starke Zunahme des poly(A)-Gehalts statt, zu einem Zeitpunkt also, wo auch eine starke Sekretion von Zellwandkomponenten ins Medium vorliegt. Daraus vermuten die Autoren einen Zusammenhang zwischen polyadenylierter mRNA und der Synthese sekretorischer Proteine. Weitere Untersuchungen (so z.B. die in-vitro-Translation der poly(A)-RNA) müssen durchgeführt werden, um diesen Zusammenhang zu klären.

Allerdings sprechen die Befunde dieser Arbeit gegen diese Funktion, da die Polyadenylierung die überwiegende Mehrheit der mRNA-Population in B. brevis (ATCC 9999) betrifft und nicht etwa spezifische mRNAs (wie es im Zusammenhang mit sekretorischen Proteinen der Fall wäre).

5.5 Aussichten

Obwohl die in dieser Arbeit untersuchten Nährmedien keinen wesentlichen Einfluß auf den poly(A)-RNA-Gehalt von B. brevis (ATCC 9999) zeigen, wäre eine genauere Untersuchung des möglichen Einflusses von bestimmten Nährstofflimitierungen auf das Auftreten von poly(A)-RNA von Interesse. Eine Abhängigkeit des poly(A)-RNA-Gehalts von phosphatlimitierenden Bedingungen konnte für E. coli-RNA gezeigt werden (Srinivasan et al., 1975), bei hohen Phosphatkonzentrationen im Nährmedium sank der poly(A)-haltige Anteil pulsmarkierter RNA von 15 % auf weniger als 1,5 %.

Eine Induktion der Sporulation bei Phosphatlimitierung des Wachstumsmediums konnte für Bacillus megaterium (Grelet, 1957) gezeigt werden. Ähnliche Ergebnisse wurden auch bisher für B. subtilis erzielt (Hutchinson und Hanson, 1974); offensichtlich wird durch die Phosphatlimitierung ein Abfall der ATP-Konzentration in den Zellen und damit der Beginn der Sporulation ausgelöst.

In diesem Zusammenhang wäre auch die Untersuchung von sporulationsnegativen Mutanten (vor allem von spo0-Mutanten) von B. brevis auf ihren poly(A)-RNA-Gehalt von Interesse. Obwohl in dieser Arbeit kein unmittelbarer Zusammenhang zwischen Polyadenylierung von mRNA und sporulationsspezifischen Transkripten festgestellt wird, könnten durchaus indirekte Zusammenhänge zwischen Abnahme des ATP-Spiegels gegen Ende der exponentiellen Wachstumsphase, Polyadenylierung von RNA und Auslösung der Sporulation bestehen, wie sie im vorgehenden Abschnitt, 5.4, erwähnt wurden.

Von besonderem Interesse ist die Frage, ob die verstärkte Polyadenylierung in B. brevis durch die Induktion einer spezifischen poly(A)-Polymerase gegen Ende des exponentiellen Wachstums ausgelöst wird, die während des exponentiellen Wachstums nur geringe Aktivität aufweist. Die Isolierung und Charakterisierung dieses Enzyms könnte die Frage klären, ob deren Regulation auf genetischer oder auf enzymatischer Ebene (katabolische Derepression) erfolgt.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Mit Hilfe von verbesserten Methoden zur Präparation von gesamtzellulärer RNA und Polyribosomen konnte in dieser Arbeit das Auftreten von poly(A) in Abhängigkeit der Wachstumsphase von B. brevis (ATCC 9999) gezeigt werden.

Dabei wurde festgestellt, daß in der späten exponentiellen Wachstumsphase (in der ein Zelldifferenzierungsprozeß eingeleitet wird) eine starke Zunahme des poly(A)-Gehalts stattfindet. Dieser Effekt ist in gesamtzellulärer RNA wesentlich signifikanter als in Polyribosomen. Innerhalb der stationären Phase (t_3) nimmt die Polyadenylierungsreaktion wieder ab, der Gehalt an polyadenylierter RNA verringert sich wesentlich stärker als die in den Zellen vorkommende poly(A)-Menge, die wahrscheinlich wesentlich stabiler gegenüber RNasen-Abbau ist.

Variationen des Anzuchtmediums von B. brevis (ATCC 9999) führen zu keinem wesentlich veränderten poly(A)-Gehalt in den Zellen, auch solche Medien nicht, die spezifisch sporulationsauslösend sind. Deshalb scheint kein direkter Zusammenhang mit der verstärkten Polyadenylierung in der späten exponentiellen Wachstumsphase und der Einleitung des Sporulationsprozesses zu bestehen. Die Charakterisierung durch Ultrazentrifugation der poly(A)-RNA aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen ergibt, daß bevorzugt im Bereich zwischen 4 S und 16 S RNA polyadenyliert wird, in der stationären Phase nimmt die Größenverteilung der polyadenylierten RNA ab.

Verdauungsexperimente konnten die Annahme bestätigen, daß sich die poly(A)-Segmente überwiegend (zu mehr als 80 %) am 3'-Ende der RNA befinden. Die Bestimmung der Länge der poly(A)-Segmente aus den unterschiedlichen Wachstumsphasen ergab eine ähnliche Größenverteilung mit einer Durchschnittslänge von 42 Nukleotiden, in der stationären Phase zeigte sich allerdings eine gewisse Verkleinerung der poly(A)-Segmente (35 Nukleotide Durchschnittslänge). Offensichtlich verursacht also die Zunahme des poly(A)-Gehalts in der späten exponentiellen Phase keine Verlängerung der poly(A)-Segmente, sondern eine Zunahme der polyadeny-

lierten RNA-Menge.

Aufgrund eines (RNase-armen) zellfreien Extraktes aus E. coli D-10 konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, daß es sich bei den isolierten poly(A)-RNA-Proben tatsächlich um mRNA handelt.

Vergleichende Untersuchungen der Translationsaktivität polyadenylierter und nicht-polyadenylierter RNA haben gezeigt, daß parallel zur verstärkt einsetzenden Polyadenylierungsreaktion in der späten exponentiellen Phase auch der relative Anteil der polyadenylierten mRNA an der Gesamt-RNA zunimmt; er beträgt allerdings nie mehr als 10 % der gesamten Translationskapazität.

Vergleicht man die Translationsaktivität der Polyribosomen und der gesamtzellulären (polyadenylierten oder nicht polyadenylierten) RNA, so stellt man fest, daß sie in der Mitte der exponentiellen Phase am höchsten ist. Sie nimmt gegen Ende der exponentiellen Phase trotz der einsetzenden Polyadenylierungsreaktion ab; damit scheinen beide Vorgänge in keinem direkten Zusammenhang zu stehen. Die fluorographische Darstellung der in-vitro-Translationsprodukte zeigt, daß beide mRNA-Populationen (poly(A)-haltig und nicht poly(A)-haltig) überwiegend (zu mehr als 90 %) für dieselben Produkte codieren.

LITERATURVERZEICHNIS

- Adams, D.S., Noonan, D., and Jeffery, W.R., 1980, Anal. Biochemistry 103: 408-412, An improved method for the isolation of polysomes from synchronous macroplasmodia of Physarum polycephalum.
- Adesnik, M., and Darnell, J.E., 1972, J.Mol.Biol. 67: 397-406, Biogenesis and characterization of histone messenger RNA in Hela cells.
- Agutter, P.S., and Richardson, I.C.W., 1980, J.Cell Sci. 44: 395-435, Nuclear non-chromatin proteinaceous structures: their role in the organization and function of the interphase nucleus.
- August, J.T., Ortiz, P.J., and Hurwitz, J., 1961, J.Biol.Chem. 237: 3786-3793, Ribonucleic acid-dependent ribonucleotide incorporation.
- Bannon, G.A., Calzone, F.J., Bowen, J.K., Allis, C.D., and Gorovsky, M.A., 1983, Nucleic Acids Res. 11: 3903-3918, Multiple, independently regulated, polyadenylated messages for histone H3 and H4 in Tetrahymena.
- Bard, E., Efron, D., Marcus, A., and Perry, R.P., 1974, Cell 1: 101-106, Translational capacity of deadenylated messenger RNA.
- Bastos, R.N., and Aviv, H., 1977, Cell 11: 641-650, Globin RNA precursor molecules: biosynthesis and processing in erythroid cells.
- Bergmann, I.E., and Brawerman, G., 1977, Biochemistry 16: 259-264, Control of breakdown of the polyadenylate sequence in mammalian polyribosomes: role of polyadenylic acid-protein interactions.
- Bernd, A., Schröder, H.C., Zahn, R.K., and Müller, W.E.G., 1982, Eur.J.Biochem. 129: 43-49, Modulation of the nuclear-envelope nucleoside triphosphatase by poly(A)-rich mRNA and by microtubule protein.

- Bina, M., Feldmann, R.J., and Deeley, R.G., 1980, Proc.Natl., Acad.Sci. USA 77: 1278-1282, Could poly(A) align the splicing sites of messenger RNA precursors?
- Bonner, W.M., and Laskey, R.A., 1974, Eur.J.Biochem. 46: 83-88, A film detection method for tritium-labelled proteins and nucleic acids in polyacrylamide gels.
- Bradford, M.M., 1976, Anal. Biochemistry 72: 248-254, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.
- Brawerman, G., 1975, Prog.Nucleic Acid Res.Mol.Bio. 17: 117-148, Characteristics and significance of the polyadenylate sequence in mammalian messenger RNA.
- Brawerman, G., and Diez, J., 1975, Cell 5: 271-280, Metabolism of the polyadenylate sequence of nuclear RNA and messenger RNA in mammalian cells.
- Brawerman, G., 1981, Crit. Rev. Biochem. 10: 1-38, The role of the poly(A) sequence in mammalian messenger RNA.
- Carlin, R.K., 1980, J. theor. Biol. 82: 353-362, Poly(A): A new evolutionary probe.
- Clark jr., J.M., and Switzer, R.L., 1972, in: Experimental Biochemistry (2nd edition), W.H. Freeman and Co., San Francisco.
- Cleares, G.R., Jones, T., and Dubin, D.T., 1976, Arch.Biochem. Biophys. 175: 303-311, Properties of a discrete high-molecular weight poly(A) containing mitochondrial RNA.
- Crouch, D.H., Ownby, J.D., and Carr, N.G., 1983, J.Bacteriol. 156: 979-982, Polyadenylated RNA in two filamentous cyanobacteria.
- Darnell, J.E., Jelinek, W.R., and Molloy, G.R., 1973, Science 181: 1215-1221, Biogenesis of mRNA: genetic regulation in mammalian cells.

- Darnell, J.E., 1976, Prog. Nucleic Acid Res.Mol.Biol. 19: 493-511, mRNA structure and function.
- Derman, E., and Darnell, J.E., 1974, Cell 3: 255-264, Relationship of chain transcription to poly(A) addition and processing of hnRNA in Hela cells.
- Deutscher, M.P., 1978, J.Biol.Chem. 253: 5579-5584, Synthesis and degradation of poly(A) in permeable cells of E.coli.
- Diez, J., and Brawerman, G., 1974, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 71: 4091-4095, Elongation of the polyadenylate segment of messenger RNA in the cytoplasm of mammalian cells.
- Doel, M.T., and Carey, N.H., 1976, Cell 8: 51-58, The translational capacity of deadenylated ovalbumin messenger RNA.
- Fitzgerald, M., and Shenk, T., 1981, Cell 24: 251-260, The sequence 5'-AAUAAA-3' forms part of the recognition site for polyadenylation of late SV 40 mRNAs.
- Frank, J.J., and Levy, C.C., 1976, J.Biol.Chem. 251: 5745-5751, Properties of a human liver ribonuclease: inhibition by polynucleotides and specificity for phosphodiester bond cleavage to yield purine nucleosides at the 5' termini.
- Fraser, N.W., Nevins, J.R., Ziff, E., and Darnell, J.E., 1979, J.Mol.Biol. 129: 643-656, The major late adenovirus type-2 transcription unit: termination is downstream from the last poly(A) site.
- Gedamu, L., and Dixon, G.H., 1976, J.Biol.Chem. 251: 1455-1463, Purification and properties of biologically active rainbow trout testis protamine mRNA.
- Gerlinger, P., Krust, A., Le Meur, M., Perrin, F., Cochet, M., Gannon, F., Dupret, D., and Chambon, P., 1982, J.Mol. Biol. 162: 345-364, Multiple initiation and polyadenylation sites for the chicken ovomucoid transcription unit.
- Goldenberg, C.J., and Raskas, H.J., 1979, Cell 16: 131-138, Splicing patterns of nuclear precursors to the mRNA for adenovirus-2 DNA binding protein.

- Gopalakrishna, Y., Langley, D., and Sarkar, N., 1981, *Nucleic Acids Res.* 9: 3545-3554, Detection of high levels of polyadenylate-containing RNA in bacteria by the use of a single-step RNA isolation procedure.
- Gopalakrishna, Y., and Sarkar, N., 1981, *Biochem.Biophys.Res. Commun.* 103: 454-460, Selective resistance of bacterial polyadenylate-containing RNA to hydrolysis by guanosine 3'-5'-monophosphate-sensitive nuclease of Bacillus brevis.
- Gopalakrishna, Y., and Sarkar, N., 1982a, *Biochemistry* 21: 2724-2729, Characterization of polyadenylate-containing ribonucleic acid from Bacillus subtilis.
- Gopalakrishna, Y., and Sarkar, N., 1982b, *J.Biol.Chem.* 257: 2747-2750, The synthesis of DNA complementary to polyadenylate-containing RNA from Bacillus subtilis.
- Gopalakrishna, Y., and Sarkar, N., 1983, *Arch.Biochem.Biophys.* 224: 196-205, Synthesis of polyadenylate-containing RNA in-vitro in permeable cells of Escherichia coli B.
- Graef-Dodds, E., and Chambliss, G.H., 1978, in Spores VII (Chambliss, G.H., and Vary, J.C. eds., *Am.Soc.Microbiol.*, Washington): 237-241, Isolation and partial characterization of oligodeoxythymidylate-cellulose binding RNA from Bacillus subtilis.
- Gray, R.E., and Cashmore, A.R., 1976, *J.Mol.Biol.* 108: 595-608, RNA synthesis in plant leaf tissue: the characterization of mRNA species lacking and containing polyadenylic acid.
- Greenberg, J.R., and Perry, R.P., 1972a, *J.Mol.Biol.* 72: 91-98, Relative occurrence of polyadenylic acid sequences in messenger and heterogenous nuclear RNA of L-cells as determined by poly(U)-hydroxyapatite chromatography.
- Greenberg, J.R., and Perry, R.P., 1972b, *Biochim.Biophys.Acta* 287: 361-366, The isolation and characterization of steady-state labelled messenger RNA from L-cells.

- Grelet, N., 1975, J.appl.Bacteriol. 20: 315-324, Growth limitation and sporulation.
- Grunstein, M., and Schedl, P., 1976, J.Mol.Biol. 104: 323-349, Isolation and sequence analysis of sea urchin histone H4 messenger RNA.
- Hanson, R.S., Blicharska, J., and Szulmajster, J., 1964, Biochem.Biophys.Res.Comm. 17: 1-7, Relationship between the carboxylic acid cycle enzymes and sporulation of B. subtilis.
- Hecker, M., Prösch, S., and Mach, F., 1981, Zeitschr. f. Allgemeine Mikrobiologie (DDR) 21: 35-40, Synthese poly(A)-haltiger RNA in auswachsenden Sporen von Bacillus subtilis.
- Hieter, P.A., Le Gendre, S.M., and Levy, C.C., 1976, J.Biol. Chem. 251: 3287-3293, Stabilization of an RNA molecule by 3'-terminal poly(A)-induced inhibition of RNase activity.
- Hirsch, M., and Penman, S., 1973, J.Mol.Biol. 80: 379-391, Mitochondrial polyadenylic acid-containing RNA: localization and characterization.
- Hirsch, M., and Penman, S., 1974, J.Mol.Biol. 83: 131-142, Post-transcriptional addition of polyadenylic acid to mitochondrial RNA by a cordycepin-insensitive process.
- Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Le Clercq, M., Nudel, U., Soreq, H., Solomon, R., Lebleu, B., Revel, M., and Littauer, U.Z., 1974, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71: 3143-3146, Role of the polyadenylate segment in the translation of globin messenger RNA in Xenopus oocytes.
- Huez, G., Marbaix, G., Hubert, E., Cleuter, Y., Le Clercq, M., and Chantrenne, H., 1975, Eur.J.Biochem. 59: 589-592, Readenylation of polyadenylate-free globin messenger RNA restores its stability in-vivo.

- Huez, G., Marbaix, G., Gallwitz, D., Weinberg, E., Devos, R., Hubert, E., and Cleuter, Y., 1978, *Nature* 271: 572-573, Functional stabilisation of HeLa cell histone messenger RNAs injected into Xenopus oocytes by 3'-OH polyadenylation.
- Huez, G., Bruck, C., and Cleuter, Y., 1981, *Proc.Natl.Acad. Sci. USA* 78: 908-911, Translational stability of native and deadenylated rabbit globin mRNA injected into HeLa cells.
- Hussain, I., Tsukagoshi, N., and Udaka, S., 1982, *J.Bacteriol.* 151: 1162-1170, Characterization of polyadenylated RNA in a protein-producing bacterium, Bacillus brevis 47.
- Hutchinson, K., and Hanson, R.S., 1974, *J.Bacteriol.* 119: 70-75, Adenine nucleotide changes associated with the initiation of sporulation in B. subtilis.
- Iatrou, K., and Dixon, G.H., 1977, *Cell* 10: 433-441, The distribution of poly(A)⁺ and poly(A)⁻ protamine messenger RNA sequences in the developing trout testis.
- Jacobson, A., and Favreau, M., 1983, *Nucleic Acids Res.* 11: 6353-6368, Possible involvement of poly(A) in protein synthesis.
- Jayaraman, K., and Murthy, S., 1982, *Mol.Gen.Genet.* 185: 158-164, Localization of (dA-dT)-rich sequences in the membrane-bound DNA and their possible role in sporulation of Bacillus polymixa.
- Jeffery, W.R., and Brawerman, G., 1974, *Biochemistry* 13: 4633-4637, Characterization of the steady-state population of messenger RNA and its poly(adenylic acid)segment in mammalian cells.
- Jeffery, W.R., 1978, *Biochim.Biophys.Acta* 521: 217-228, Composition and properties of messenger ribonucleoprotein fragments containing and lacking polyadenylate.
- Karpetsky, T.P., Hilter, P.A., Frank, J.J., and Levy, C.C., 1977, *Mol. Cell.Biochem.* 17: 89-99, Polyamines, ribonucleases, and the stability of RNA.

- Karpetsky, T.P., Boguski, M.S., and Levy, C.C., 1979, Subcell. Biochem. (edited by D.B. Roodyn, Plenum Press, New York) 6: 1-116, Structures, properties, and possible biologic functions of polyadenylic acid.
- Katinakis, P.K., Slater, A., and Burdon, R.H., 1980, Febs-L. 116: 1-7, Non-polyadenylated mRNAs from eukaryotes.
- Kaufmann, Y., Milcarek, C., Berissi, H., and Penman, S., 1977, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 74: 4801-4805, HeLa cell poly(A)⁻ mRNA codes for a subset of poly(A)⁺ mRNA - directed proteins with an actin as a major product.
- Kaur, S., and Jayaraman, K., 1979, Biochem.Biophys.Res.Comm. 86: 331-339, Appearance of polyadenylated RNA species during sporulation in Bacillus polymixa.
- Kerjan, P., and Szulmajster, J., 1980, Biochem.Biophys.Res.Commun. 93: 201-208, Isolation and characterization of polyadenylated RNA species from sporulating cells of Bacillus subtilis.
- Kerjan, P., Jayaraman, K., and Szulmajster, J., 1982, Mol.Gen. Genet. 185: 448-453, Studies on the nature and role of polyadenylated RNA in spore development of Bacillus subtilis.
- Kinniburgh, A.J., Mertz, J.E., and Ross, J., 1978, Cell 14: 681-693, The precursor of mouse β -globin messenger RNA contains two intervening RNA-sequences.
- Komura, S., 1982, unveröff. Ergebnisse, Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der Technischen Universität Berlin, Studies on poly(A) in a tyrocidine producing organism, Bacillus brevis ATCC 8185.
- Kwan, S.W., and Brawerman, G., 1972, Proc.Natl. Acad.Sci. USA 73: 148-151, A particle associated with the polyadenylate segment in mammalian messenger RNA.

- Laemmli, U.K., 1970, *Nature* 227: 680-685, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T₄.
- Lai, C.J., Dhar, R., and Khoury, G., 1978, *Cell* 14: 971-982, Mapping the spliced and unspliced late lytic SV 40 RNAs.
- Legault-Démare, L., and Chambliss, G.H., 1974, *J.Bacteriol.* 120: 1300-1307, Natural Messenger Ribonucleic Acid-Directed Cell-Free Protein-Synthesizing System of Bacillus Subtilis.
- Le Moullec, J.M., Akusjärvi, G., Stalhandske, P., Pettersson, U., Chambraud, B., Gilardi, P., Nasri, M., and Perri-caudet, M., 1983, *J.Virol.* 48: 127-134, Polyadenylic acid addition sites in the adenovirus type-2 major late transcription unit.
- Levy, C.C., Schmukler, M., Frank, J.J., Karpetsky, T.P., Jewett, P.B., Hieter, P.A., Le Gendre, S.M., and Dorr, R.G., 1975, *Nature* 256: 340-342, Possible role for poly(A) as an inhibitor of endonuclease activity in eukaryotic cells.
- Lewis, F.S., Rutman, R.J., and Avadhani, N.G., 1976, *Biochemistry* 15: 3367-3372, Messenger ribonucleic acid metabolism in mammalian mitochondria: discrete poly(adenylic acid) lacking messenger ribonucleic acid species associated with mitochondrial polysomes.
- Littauer, U.Z., Soreq, H., and Cornelis, P., 1980, *Enzyme Regul. Mech. Action, Proc. FEBS Meet.* 60: 233.
- Littauer, U.Z., and Soreq, H., 1982, *Prog.Nucleic Acid Res.Mol. Biol.* 27: 53-83, The regulatory function of poly(A) and adjacent 3'-sequences in translated RNA.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., and Randall, R.J., 1951, *J.Biol.Chem* 193: 265-275, Protein measurement with the Folin phenol reagent.

- Mager, W.H., Hoving, R., and Planta, R.J., 1975, FEBS L. 58: 219-221, In-vitro synthesis of yeast ribosomal proteins.
- Majumdar, P.K., and Vipparti, V.A., 1980, FEBS L. 109: 31-33, Polyadenylated messenger RNAs code for photo reaction center and light-harvesting antenna polypeptides of Rhodospirillum rubrum.
- Mendecki, J., Lee, S.Y., and Brawerman, G., 1972, Biochemistry 11: 792-798, Characteristics of the polyadenylic acid segment associated with messenger ribonucleic acid in mouse sarcoma 180 ascites cells.
- Montell, C., Fisher, E.F., Caruthers, M.H., and Berk, A.J., 1983, Nature 305: 600-605, Inhibition of RNA cleavage but not polyadenylation by a point mutation in mRNA 3'-consensus sequence AAUAAA.
- Müller, W.E.G., Schröder, H.C., Arendes, J., Steffen, R., Zahn, R.K., and Dose, K., 1977, Eur.J.Biochem. 76: 531-540, Alterations of activities of ribonucleases and polyadenylate polymerase in synchronized mouse L-cells.
- Müller, W.E.G., Arendes, J., Zahn, R.K., and Schröder, H.C., 1978, Eur.J.Biochem. 86: 283-290, Control of enzymic hydrolysis of polyadenylate segment of messenger RNA: role of polyadenylate-associated proteins.
- Müller, W.E.G., Bernd, A., and Schröder, H.C., 1983, Mol.Cell. Biochem. 53/54: 197-220, Modulation of poly(A)(+)mRNA -metabolizing and transporting systems under special consideration of microtubule protein and actin.
- Nakazato, H., Venkatesan, S., and Edmonds, M., 1975, Nature 256: 144-146, Polyadenylic acid sequences in E.coli messenger RNA.
- Neijssel, O.M., and Tempest, D.W., 1976, Arch.Microbiol. 110: 305-311, The role of energy - spilling reactions in the growth of Klebsiella aerogenes NCTC 418 in aerobic chemostat culture.

- Nemer, M., Dubroff, L.M., and Graham, M., 1975, Cell 6: 171-178, Properties of sea urchin embryo messenger RNA containing and lacking poly(A).
- Neuwelt, E.A., Frank, J.J., and Levy, C.C., 1976, J.Biol.Chem. 251: 5752-5758, Purification of human spleen ribonuclease by immunoabsorption.
- Nudel, U., Soreq, H., Littauer, U.Z., Marbaix, G., Huez, G., Le Clercq, M., Hubert, E., and Chantrenne, H., 1976, Eur. J.Biochem. 64: 115-121, Globin mRNA species containing poly(A) segments of different lengths: their functional stability in Xenopus oocytes.
- Ohta, N., Sanders, M., and Newton, A., 1975, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 72: 2343-2346, Poly(adenylic acid) sequences in the RNA of Caulobacter crescentus.
- Ohta, N., Sanders, M., and Newton, A., 1978, Biochim.Biophys. Acta 517: 65-75, Characterization of unstable poly(A)-RNA in Caulobacter crescentus.
- Ojala, D., and Attardi, G., 1974a, J.Mol.Biol. 82: 151-174, Expression of the mitochondrial genome in HeLa cells. XIX. Occurrence in mitochondria of polyadenylic acid sequences, free and covalently linked to mitochondrial DNA-coded RNA.
- Ojala, D., and Attardi, G., 1974b, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 71: 563-567, Identification of discrete polyadenylate-containing RNA components transcribed from HeLa cell mitochondrial DNA.
- Perlman, S., Abelson, H., and Penman, S., 1973, Proc.Natl.Acad. Sci. USA 70: 350-353, Mitochondrial protein synthesis: RNA with the properties of eukaryotic messenger RNA.
- Perry, R.P., Kelley, D.E., and La Torre, J., 1972, Biochem. Biophys.Res.Comm. 48: 1593-1600, Lack of polyadenylic acid sequences in the messenger RNA of E.coli.
- Proudfoot, N.J., and Brownlee, G.G., 1976, Nature 263: 211-214, 3' non-coding region sequences in eukaryotic messenger RNA.

- Revel, M., and Groner, Y., 1978, *Ann.Rev.Biochem.* 47: 1079-1126, Post-transcriptional and translational controls of gene expression in eukaryotes.
- Sarkar, N., Langley, D., and Paulus, H., 1978, *Biochemistry* 17: 3465-3474, Isolation and characterization of polyadenylate-containing RNA from Bacillus brevis.
- Schibler, U., Marcu, K.B., and Perry, R.P., 1978, *Cell* 15: 1495-1509, The synthesis and processing of the messenger RNAs specifying heavy and light chain immunoglobins in MPC-11 cells.
- Schultz, G.A., Chaconas, G., and Moore, R.L., 1978, *J.Bacteriol.* 133: 569-575, Polyadenylic sequences in the RNA of Hyphomicrobium.
- Schwartz, H., and Darnell, J.E., 1976, *J.Mol.Biol.* 104: 833-851, The association of protein with the polyadenylic acid of HeLa cell messenger RNA: evidence for a transport role of a 75,000 molecular weight polypeptide.
- Sehgal, P.B., Soreq, H., and Tamm, I., 1978, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 75: 5030-5033, Does 3'-terminal poly(A) stabilize human fibroblast interferon mRNA in oocytes of Xenopus laevis?
- Semancik, J.S., 1974, *Virology* 62: 288-291, Detection of polyadenylic sequences in plant pathogenic RNAs.
- Sheiness, D., and Darnell, J.E., 1973, *Nature* 241: 265-268, Polyadenylic acid segment in mRNA becomes shorter with age.
- Sippel, A.E., Stavrianopoulos, J.G., Schutz, G., and Feigelson, P., 1974, *Proc.Natl.Acad.Sci. USA* 71: 4635-4639, Translational properties of rabbit globin mRNA after specific removal of poly(A) with ribonuclease H.
- Soreq, H., Nudel, U., Salomon, R., Revel, M., and Littauer, U.Z., 1974, *J.Mol.Biol* 88: 233-245, In-vitro translation of polyadenylic acid-free rabbit globin messenger RNA.

- Soreq, H., Sagar, D.A., and Sehgal, P.B., 1981, Proc.Natl.Acad. Sci. USA 78: 1741-1745, Translational activity and functional stability of human fibroblast β_1 and β_2 interferon mRNAs lacking 3'-terminal RNA sequences.
- Srinivasan, P.R., Ramanarayan, M., and Rabbani, E., 1975, Proc. Natl.Acad.Sci. USA 72: 2910-2914, Presence of polyribadenylate sequences in pulse-labelled RNA of Escherichia coli.
- Stoltzfus, C.M., Shatkin, A.J., and Banerjel, A.K., 1973, J. Biol.Chem. 248: 7993-7998, Absence of polyadenylic acid from reovirus messenger ribonucleic acid.
- Williams, D.L., and Klett, H., 1978, Anal. Biochemistry 91: 173-179, Measurement of polyadenylic acid by hybridization with polyuridylic acid: a source of error due to the lability of tritiated polyuridylic acid in trichloroacetic acid.
- Wilson, M.C., Sawicki, S.G., White, P.A., and Darnell jr., J.E., 1978, J.Mol.Biol. 126: 23-36, A correlation between the rate of poly(A)-shortening and half-life of messenger RNA in adenovirus transformed cells.
- Wilt, F.H., 1973, Proc.Natl.Acad.Sci. USA 70: 2345-2349, Polyadenylation of maternal RNA of sea urchin eggs after fertilization.
- Woodland, H.R., and Wilt, F.H., 1980, Develop. Biol. 75: 199, The functional stability of sea urchin histone mRNA injected into oocytes of Xenopus laevis.
- Wooley, D.E., and Jones, P.C.T., 1970, J.Cell.Physiol. 76: 191-196, Correlation of adenosine phosphate levels with cellular morphology in Dictyostelium discoideum amoebae.
- Yamada, H., Tsukagoshi, N., and Uda, S., 1981, J.Bacteriol. 148: 322-332, Morphological alterations of cell wall concomitant with protein release in a protein-producing bacterium, Bacillus brevis 47.

- Zeevi, M., Nevins, J.R., and Darnell, J.E., 1981, Cell 26: 39-46, Nuclear RNA is spliced in the absence of poly(A) addition.
- Zeevi, M., Nevins, J.R., and Darnell jr., J.E., 1982, Mol.Cell. Biol. 2: 517-525, Newly formed mRNA lacking polyadenylic acid enters the cytoplasm and the polyribosomes but has a shorter half-life in the absence of polyadenylic acid.

Herrn Prof. Dr. E.-R. Lochmann danke ich für die Vergabe dieser Arbeit und seine ständige Unterstützung bei deren Durchführung.

Herrn Prof. Dr. E. Riedel danke ich für die Begutachtung dieser Arbeit.

Meinen ganz besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. N. Käufer für seine ständige Hilfs- und Diskussionsbereitschaft aussprechen, weiterhin Herrn Dr. H. v. Döhren und Dr. M. Marahiel vom Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der Technischen Universität Berlin.

Tabellarischer Lebenslauf

Michael Altmann

geboren	am 13.8.1952 in Frankfurt/Main
Sohn des	Kaufmannes Horst Altmann (gestorben 1961) und seiner Ehefrau Lisel Altmann, geb. Kern
Schulausbildung	1958-1971 an der Deutschen Schule in Madrid (Spanien) Abitur am 8.6.1971 dort abgeschlossen
Hochschulstudium	ab Wintersemester 1971/72 an der Technischen Universität Berlin, Fachrichtung Chemie Vordiplom am 2. November 1973 abgeschlossen Diplomarbeit: "Kinetische Untersuchungen an der Gramicidin S Synthetase" am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der Technischen Universität Berlin Hochschulstudium am 16. Juni 1977 als Dipl. Ing. Chemiker abgeschlossen Doktorarbeit: "Untersuchungen zur Polyadenylierung von RNA in Bacillus brevis - Stamm ATCC 9999" seit 1981 am Institut für Biochemie und Molekular- biologie der Freien Universität Berlin
Berufserfahrung	Oktober 1977- Oktober 1978 wissenschaftlicher An- gestellter am Institut für Biochemie und Molekulare Biologie der Technischen Universität Berlin November 1978-September 1982 wissenschaftlicher Assistent am selbigen Institut

